

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2000年12月7日 (07.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/72670 A1

(51) 国際特許分類: A01K 67/027, C12N 15/63, 5/10

(JP). イエネ ディーター イー (JENNE, Dieter E.) [DE/DE]; D-82061 ノイリード市クラマーストリート 4 Neuried (DE).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/03504

(22) 国際出願日: 2000年5月31日 (31.05.2000)

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatushi et al.) ; 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) 優先権データ:
特願平11/153030 1999年5月31日 (31.05.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 中外分子医学研究所 (CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.) [JP/JP]; 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 Ibaraki (JP). 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 根津淳一 (NEZU, Jun-ichi) [JP/JP]. 大瀬飛鳥 (OSE, Asuka) [JP/JP]; 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 株式会社中外分子医学研究所内 Ibaraki (JP). 寺社下浩一 (JISHAGE, Kou-ichi) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: LKB1 GENE KNOCKOUT ANIMALS

(54) 発明の名称: LKB1遺伝子ノックアウト動物

(57) Abstract: Mammals capable of period-specifically and tissue-specifically disrupting LKB1 gene. These mammals are highly useful as a tool for clarifying the onset mechanism of diseases based on the defect of LKB1 gene (for example, Peutz-Jeghers syndrome and cancer) and developing remedies, treatment methods, etc. therefor.

(57) 要約:

WO 00/72670 A1

LKB1遺伝子を時期特異的、組織特異的に破壊しうる哺乳動物が提供された。本発明の哺乳動物は、ポイツ・イエーガー症候群や、その他癌などのLKB1遺伝子の欠損に基づく疾病の発症機構の解明、及び治療薬、治療法等の開発の為のツールとして非常に有用である。

明細書

LKB1 遺伝子ノックアウト動物

技術分野

本発明は、LKB1 遺伝子の機能が欠損した哺乳動物、およびその作製方法に関する。ヒト LKB1 遺伝子はポイツ・イエーガー症候群の原因遺伝子であり、該哺乳動物は該疾患の治療法や治療薬開発のために利用されうる。

背景技術

ポイツ・イエーガー症候群(Peutz-Jeghers Syndrome, MIM 175200, PJS)は、消化管におけるポリポーシス症と、粘膜や皮膚における色素班形成を主な症候とするヒトの遺伝病である。PJS は常染色体優性遺伝形式により遺伝するが、1997 年 Hemminki 等により、PJS 患者家系における連鎖（リンクエージ）解析からその原因遺伝子は第 19 番染色体 p13.3 領域にマップされることが示された (Hemminki A et al, Nat Genet 1997 Jan;15(1):87-90)。この領域には本発明者らが見いだしていた新規セリン／スレオニンキナーゼ LKB1 が存在することから、Jenne 等はこれを原因遺伝子の候補であると考え、PJS 患者における LKB1(STK11) 遺伝子の変異解析を行ったところ、調べた全ての患者において LKB1 遺伝子の変異が存在することが明らかとなった (PCT/JP98-05357; Jenne DE et al, Nat Genet 1998 Jan;18(1):38-43)。さらに、他のグループからも同様の報告が相次いでなされ、現在までに少なくとも 60 種類以上の LKB1 遺伝子変異が PJS 患者において見いだされている (Hemminki A et al, Nature 1998 Jan 8;391(6663):184-7; Nakagawa H et al, Hum Genet 1998 Aug;103(2):168-72; Resta N et al, Cancer Res 1998 Nov;58(21):4799-801; Ylikorkala A et al, Hum Mol Genet 1999 Jan;8(1):45-51)。さらに本発明者らは、LKB1 遺伝子産物が自己リン酸化能を持つキナーゼで

あり、PJS 患者において見いだされたミスセンス変異はキナーゼ活性を失う変異であることの証明を行った(Mehenni H et al, Am J Hum Genet 1998 Dec;63(6):1641-50)。これらのことより、LKB1 セリン／スレオニンキナーゼの遺伝子変異による機能欠損が PJS の発症原因であることが確証されるに至っている。

また、PJS 患者は様々な癌に対する発症リスクが健常人に比較し著しく増加していることが疫学的研究から知られており、このことからその原因遺伝子は癌抑制遺伝子様の活性を持つことが推測されていた。実際、PJS と無関係な散発性の癌においても LKB1 遺伝子の変異がみられることが報告されてきており、一般の散発性癌においても LKB1 遺伝子の不活が関与していることが明らかとなりつつある (Dong SM et al, Cancer Res 1998 Sep 1;58(17):3787-90; Rowan A et al, J Invest Dermatol 1999 Apr;112(4):509-11; Goldberg P et al, Oncogene 1999 Mar 4;18(9):1777-80)。しかし、正常細胞における LKB1 の具体的な生理機能や、その不活化がポリポーラス症や癌化などを引き起こすメカニズムについては未だ全く不明のままである。

発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、LKB1 の機能解析や LKB1 の変異に起因する疾患ための薬剤の開発に有用な非ヒト哺乳動物を提供することを課題とする。より詳しくは、LKB1 遺伝子の発現が人為的に抑制されたノックアウト動物およびその作製方法を提供することを課題とする。本発明の好ましい態様においては、内在性 LKB1 遺伝子を誘導的に欠損させることができる非ヒト哺乳動物を提供する。

本発明者らは、人為的に LKB1 遺伝子を欠損させた、または欠損を誘導することができる哺乳動物モデルの作製を試みた。具体的には、実施例に詳しく示されるように、マウス LKB1 遺伝子 (ゲノム DNA、cDNA) のクローニングを行い、これを用いて相同組み換え用のベクターを構築し、これをマウス胚性幹細胞 (ES 細胞)

に導入して組み換えクローンを得て、それをマウス個体に戻すという手法により変異した LKB1 遺伝子を持つマウスを得ることに成功した。本発明者等は、該マウスの作成において、Cre-loxP システム（後述）を利用することにより、時期特異的、また組織特異的に LKB1 遺伝子変異を誘発することを可能にした。これにより、従来問題であった目的遺伝子の不活性化が胎児性致死を引き起こす可能性を回避した。本発明により得られた哺乳動物（あるいはそれから樹立した細胞株）は、PJS や癌などの LKB1 遺伝子の欠損に基づく各種疾患の発症メカニズムを解明するためのツールとして、さらにはこれらの疾患に対する治療法や治療薬の開発に対しても非常に有用なツールであると考えられ、様々な目的に応用されることが期待される。

本発明は、LKB1 遺伝子の発現を人為的に抑制しうる、または抑制された非ヒト哺乳動物およびその作製方法に関し、より具体的には、

- (1) 内在性 LKB1 遺伝子の発現を人為的に抑制することができる非ヒト哺乳動物、
- (2) 内在性 LKB1 遺伝子の発現の抑制を、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部を欠損させることにより誘導する、(1)に記載の非ヒト哺乳動物、
- (3) ゲノム上の LKB1 遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部が、少なくとも 1 組の loxP 配列により挟まれた構造を有する、(1) または (2) に記載の非ヒト哺乳動物、
- (4) げっ歯類である、(1) から (3) のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物、
- (5) マウスである、(4) に記載の非ヒト哺乳動物、
- (6) LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されている非ヒト哺乳動物、
- (7) LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現が、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部の欠損により抑制されている、(6)に記載の非ヒト哺乳動物、

- (8) げっ歯類である、(6) または (7) に記載の非ヒト哺乳動物、
- (9) マウスである、(8) に記載の非ヒト哺乳動物、
- (10) LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現の抑制を人為的に誘導することができ、かつ、個体へ分化させることが可能な非ヒト哺乳動物細胞、
- (11) LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現の抑制を、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部を欠損させることにより誘導する、(10) に記載の非ヒト哺乳動物細胞、
- (12) ゲノム上の LKB1 遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部が、少なくとも 1 組の loxP 配列により挟まれた構造を有する、(10) または (11) に記載の非ヒト哺乳動物細胞、
- (13) Cre 遺伝子を発現可能に保持している、(12) に記載の非ヒト哺乳動物細胞、
- (14) げっ歯類細胞である、(10) から (13) のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞、
- (15) マウス細胞である、(14) に記載の非ヒト哺乳動物細胞、
- (16) 胚性幹細胞である、(10) から (15) のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞、
- (17) LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されており、かつ、個体へ分化させることができ可能な非ヒト哺乳動物細胞、
- (18) LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現が、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部の欠損により抑制されている、(17) に記載の非ヒト哺乳動物細胞、
- (19) (12) に記載の非ヒト哺乳動物細胞において Cre 遺伝子を発現させることによって得られる、(18) に記載の非ヒト哺乳動物細胞、
- (20) げっ歯類細胞である、(17) から (19) のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(21) マウス細胞である、(20)に記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(22) 胚性幹細胞である、(17)から(21)のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞、

(23) (1)から(5)のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

(a) (16)に記載の非ヒト哺乳動物細胞を、妊娠した雌から得た胚に挿入する工程、および

(b) 該胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法、

(24) (6)から(9)のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

(a) (22)に記載の非ヒト哺乳動物細胞を、妊娠した雌から得た胚に挿入する工程、および

(b) 該胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法、

(25) (7)に記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

(a) (3)に記載の非ヒト哺乳動物の受精卵または胚を提供する工程、

(b) 該受精卵または胚に Cre 遺伝子を導入し、発現させる工程、および

(c) 該受精卵または胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法、

(26) (7)に記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、(3)に記載の非ヒト哺乳動物に、Cre 遺伝子を導入し、発現させる工程、を含む方法、

(27) (7)に記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、(3)に記載の非ヒト哺乳動物を、Cre 遺伝子をゲノム上有する非ヒト哺乳動物と交配させ、その後代を得る工程を含む方法、に関する。

なお、本発明において「遺伝子の発現の抑制」には、完全な抑制および部分的な抑制が含まれる。また、特定の環境下での抑制も含まれる。また、2つのアレルの一方の発現が抑制されている場合も含まれる。

相同組み換え（ノックアウト）用ベクターの構築

LKB1 の遺伝子の発現が人為的に抑制されたノックアウト動物を作製するためには、まず、LKB1 遺伝子をクローニングし、これを基に標的動物における内在性 LKB1 遺伝子を失活させるための相同組換え用ベクターを構築する。

該相同組換え用ベクターは、標的動物の内在性 LKB1 遺伝子を失活させるために設計された核酸配列を含む。このような核酸配列は、例えば、LKB1 遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部を欠失させた核酸配列でもよく、また、LKB1 遺伝子またはその発現制御領域に他の遺伝子が挿入された核酸配列であってもよい。このように LKB1 遺伝子またはその発現制御領域に挿入される他の遺伝子としては、マーカーとしても機能する遺伝子が好ましい。このような遺伝子としては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子 (G418 耐性により選択) やチミジンキナーゼ遺伝子 (ガンミクロビル耐性により選択) などの薬剤耐性遺伝子、ジフテリア毒素(DT)A 遺伝子などの毒素遺伝子、またはこれらの組み合わせを用いることができる。これら遺伝子の LKB1 遺伝子における挿入場所は、標的における内在性 LKB1 遺伝子の発現を抑制しうる位置であれば特に限定されない。

また、該核酸配列は、LKB1 遺伝子のイントロンにファージ DNA 由来の loxP (locus of X-ing-over) 配列を 2 カ所以上挿入されたものであってもよい。

loxP 配列は、部位特異的組み換え酵素の一つである Cre (Causes recombination) リコンビナーゼの認識配列である (Sternberg, N and Hamilton, D. J. Mol. Biol. 150, 467-486, 1981)。Cre リコンビナーゼは、2 つの loxP 配列を認識し、これらの間で部位特異的組み換えを起こすことによりその間の遺伝子を排除する (以下 Cre-loxP システム)。このシステムを用いた応用例を図 5 に示した。3 つの loxP 配列を有する相同組み換え用ベクターを構築し、それを、例えば、胚性肝細胞 (ES 細胞) に導入して相同組み換え体が得られたならば、この ES 細胞内に Cre を一過性に発現させることにより、コンベンショナルな遺伝子欠失を持つタイプ (タイプ 1) と、コンディショナルな遺伝子欠失を持つタイプ (タイプ 2) の両タイプの ES 細胞をさらに作製することが可能である。即ち、3 つの loxP 配列を

有するコンストラクトを用いると、1つの相同組み換え体から Cre を発現させることだけで2つの遺伝子型を持つES細胞クローニングを作製できるという利点がある。タイプ2のES細胞由来の個体は野生型の表現型を示すが、Cre 遺伝子を発現させることによりタイプ1に転換できる。

この Cre-loxP システム同様に、FRT (Flp recombinase target) 配列と、それを認識して部位特異的組み換えを起こす酵母由来の Flp リコンビナーゼとの組み合わせを用いてもよい。

クローニングした LKB1 遺伝子へのこれらの遺伝子の挿入は、試験管内において、通常の DNA 組み換え技法を用いて行うことができる (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))。

細胞のトランスフェクション

このようにして構築された相同組み換え用ベクターを、個体へ分化させることができ可能な非ヒト哺乳動物細胞（例えば、ES細胞）に導入し、該細胞中の LKB1 遺伝子との相同組み換えを行う。本発明において用いられる非ヒト哺乳動物細胞としては、その由来する生物に特に制限はないが、好ましくはげっ歯類、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギなどである。

相同組み換え用ベクターの細胞への導入は、当業者によく知られた方法、例えば、エレクトロボレーション法を利用して行うことができる。この結果、一部の細胞内においては細胞中の LKB1 遺伝子と相同組み換え用ベクターの対応する領域との間で組み換えが生じ、相同組み換え用ベクター中に構築されていた遺伝子型と野生型の遺伝子とが置き換わることとなる。このようにしてマーカー遺伝子や loxP 配列が挿入された LKB1 遺伝子を持つ細胞を得ることができる。

相同組換えベクターにおいてマーカー遺伝子を利用している場合には、所望の相同組換えが行なわれた細胞は、LKB1 遺伝子が失活し、同時にマーカー遺伝子を得ることとなるので、このマーカー遺伝子を指標とすることにより選抜を行なうことができる。例えば、マーカー遺伝子として、薬剤耐性遺伝子を用いた場合に

は、ベクター導入後の細胞を、致死濃度の薬剤の存在下で培養することにより、所望の相同組換えが行なわれた細胞を選抜することができる。

ただし、Cre-loxP システムを用いた場合は、loxP 配列とマーカー遺伝子はイントロン中に挿入されるように相同組み換え用ベクターは設計されることがあるため、その場合には、細胞内において LKB1 遺伝子が失活しているとは限らない。この場合、LKB1 遺伝子の失活は、Cre リコンビナーゼを該細胞中で発現させ、loxP 配列に挟まれた領域を排除することにより成し遂げられる。

細胞における Cre リコンビナーゼの発現は、例えば、アデノウイルスなどの発現ベクターを利用する方法や、組織特異的、あるいは時期特異的に発現を制御できるプロモーターで Cre の発現を制御したトランスジェニック動物と Cre-loxP システムを保有する動物との交配により行なうことができる。Cre の発現を制御したトランスジェニック動物と Cre-loxP システムを保有する動物との交配では、一回目の交配では、LKB1 遺伝子の一方のみが欠失する（ヘテロである）ノックアウト動物が得られるが、交配を繰り返すことにより、LKB1 遺伝子がすべて欠失するノックアウト動物を得ることができる。

胚への注入および胚の移植

本発明において ES 細胞を用いた場合には、これを胚盤胞に注入することによりキメラ胚を作製し、さらに偽妊娠させた哺乳動物の子宮角に移植して産仔を得る。注入に用いる胚盤胞は妊娠した雌の子宮を灌流することによって得ることができる。ES 細胞が発生分化中の胚に取り込まれたか否かを個体作製後に検定できるようするために、作製された個体の外部的特徴（例えば、毛色）が ES 細胞に由来する部分と胚盤胞に由来する部分とで異なるように、胚盤胞を選択することが好ましい。

次に、こうして得たキメラ動物を適当な系統の同種動物と交配させることにより産仔を得る。キメラ動物の生殖細胞が相同性組み換え体 ES 細胞に由来すれば LKB1 遺伝子が破壊された産仔を得ることができる。ただし、Cre-loxP システムを

用いた場合は、*loxP* 配列とマーカー遺伝子はイントロン中に挿入されるように相同組み換え用ベクターは設計されていることもあるので、その場合 *LKB1* 遺伝子が失活しているとは限らない。この場合、*Cre* リコンビナーゼを体細胞、あるいは受精卵などの生殖細胞に発現させることによって *LKB1* 遺伝子を失活させることができる。

本発明において ES 細胞を用いず、他の体細胞を用いる場合は、体細胞クローン動物の作製技術に従ってノックアウト動物の作製を行うことができる。具体的には、例えば

- 1) 繊維芽細胞等の ES 細胞以外の細胞を用いて、ES 細胞の場合と同様な方法によって相同組換え法により遺伝子に変異が導入された細胞を樹立する。
- 2) この細胞より、体細胞クローン動物作製の技術を応用し、変異遺伝子を持つ動物を作成する (Wilmut I. et al., 1997, ; Nature 385: 810-803; Wakayama, T. et al., 1998, Nature 394: 369-374)。
- 3) こうして生まれた変異遺伝子を持つ動物は、ES 細胞を用いた場合の F1 マウスに相当し、それ以降は ES 細胞を用いた場合と同様に使用することができる。

ノックアウト動物の用途

本発明のノックアウト動物は、*LKB1* 遺伝子の機能不全に起因する種々の疾患に対する治療薬や治療方法の開発に有用である。例えば、本発明のノックアウト動物に被検化合物を投与し、ポリープ形成、癌発生、色素斑形成に対する影響を検査し、所望の効果を示す化合物を選択する。

また、ノックアウト動物から調製された細胞を用いた治療薬や治療方法の開発も考えられる。例えば、本発明のノックアウト動物の胚などから細胞を調製し、被検化合物を添加し、細胞の増殖、寒天中などにおけるコロニー形成能、フォーカス形成能、移動能などに対する影響を調べる。その結果、所望の効果を示す化合物を選択する。細胞は、初代培養細胞を用いることもできれば、株化した細胞を作製して用いることもできる。以上によりスクリーニングされた化合物は医薬

品の候補となる。

図面の簡単な説明

図1は、上部は、マウス LKB1 遺伝子のエキソン／イントロン構造を表す。各エキソンをボックスで示した。特にタンパクをコードする部分は斜め線のボックスで表した。下は、2つのコスミドクローンによりカバーされる領域を表す。

図2は、マウス LKB1 遺伝子のエキソン 2 からエキソン 10 までの塩基配列を、エキソン部分を大文字で、イントロン部分を小文字で表した図である。

図3は、図2の続きである。

図4は、図3の続きである。

図5は、Cre-loxP システムの応用例。黒い三角が loxP 配列を表す。Cre リコンビナーゼの発現により部位特異的相同組み換えが起こり、二つのタイプの遺伝子型（タイプ1、タイプ2）が得られる。

図6は、F23 合成リンカーおよび loxP2 合成リンカーの構造を示す図である。

図7は、相同組み換え用ベクターの模式図と、このベクターの導入により構築される遺伝子型の模式図。×印で示した領域において相同組み換えが起こり、組み換えアリルが生じる。これに Cre リコンビナーゼを発現させることにより、コンディショナルターゲッティングと、コンベンショナルターゲッティングの2種類の遺伝子型が生じる。

図8は、各 ES 細胞クローンの遺伝子型検査の写真である。PCR 解析（左）及びサザンプロット解析（右）のいずれにおいても組み換え変異アリルが存在することが確かめられた。

図9は、キメラマウスの交配によって得られた F1 マウスのサザンプロットによる遺伝子型検査の写真である。右のパネルに示したマウスにおいては、正常アリルと共に変異アリルを示すバンドがみられ、ES 細胞の変異アリルが F1 マウスに伝達されていることが確かめられた。数字は、それぞれのマウスが由来する ES

細胞クローンを表す。

図10は、組み換えアリル、コンディショナルアリル、及びヌルアリルの模式図である。各プライマー及び各プローブの相対的な位置を表す。

図11

A ヌルアリルを検出するプライマーセット (A セット) による PCR の結果を示す写真である。N はヌルアリル由来のバンド (約 2.1 kbp) がみられるサンプル。0 はそれ以外のアリルを持つサンプル。

B ヌルアリルを検出するプライマーセット (B セット) による PCR の結果を示す写真である。N はヌルアリル由来のバンド (約 1.2 kbp) がみられるサンプル。0 はそれ以外のアリルを持つサンプル。

C プローブ7を用いたサザンプロット法による解析の結果を示す写真である。N はヌルアリル由来のバンドがみられるサンプル。W は野性型アリル由来のバンドのみが見られるサンプル。全てのサンプルに野性型アリル由来のバンドが見られる。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例 1] LKB1 遺伝子の相同組み換え用ベクターの作製

本実施例では、マウス LKB1 遺伝子の相同組み換え用ベクターを構築するために、まずマウス LKB1 ゲノム遺伝子のクローニングを行った。このゲノム DNA を用い、Yagi らの報告 (Yagi, T et al. Analytical Biochemistry 214:77-86, 1993) に従ってポジティブ/ネガティブセレクションを行うために、ネオマイシン耐性遺伝子およびジフテリア毒素 A 遺伝子を挿入した相同組み換え用ベクターを構築した。この際、ネオマイシン耐性遺伝子の両端及びイントロン 8 の計 3 カ所に同じ向きになるように loxP 配列を挿入し、Cre リコンビナーゼによる部位特異的相同組み

換えが可能となるようにした。以下具体的に説明する。

A. マウス LKB1 遺伝子のクローニング

ヒト LKB1 cDNA の配列を用いデーターベースをサーチすることにより、これと非常に高い相同意を示すマウス由来の EST(Expressed Sequence Tag)をいくつか見いだした。これらの配列から MPJ 85 プライマー(5' GATGAATTCCGAAGGACAGAGGA CAAAGAGTGG 3' : 配列番号 : 4)及び LK E2 プライマー(5' GATGAATTCTTAGAGGTCTT CTTCTGAGATGAGCTCTGCTCCTGCTGCTGCAGGCCGA 3' : 配列番号 : 5)を作製し、マウス 17 日目胚由来 Marathon Ready™ cDNA (CLONTECH)を錆型とした PCR を行い、マウス LKB1 の全オープンリーディングフレーム(ORF)を含む cDNA を増幅した。これをプライマーの両端に付加した EcoRI で切断し、pcDNA3 ベクター(Invitrogen)にサブクローニングした。複数のクローンをシークエンシングすることにより遺伝子の配列の決定を行った。また、マウス LKB1 cDNA の 5' 側は 5' RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends 法)によりクローニングした。すなわち、マウス 17 日目胚由来 Marathon Ready™ cDNA(CLONTECH)を錆型とし、MPJ15 プライマー(5' TG CGCAGCTTTCTTGAGGA 3' : 配列番号 : 6)とキットに添付されたアダプタープライマー(AP1 プライマー)を用いた PCR を行い、増幅された約 400bp の断片を TA クローニング法にて pT7Blue-T ベクター (Novagen) にサブクローニングした。得られたサブクローンを複数シークエンシングすることによりマウス LKB1 cDNA の 5' 側の配列を決定した。こうして得られたマウス LKB1 cDNA の配列を配列番号 : 1 に、またそのアミノ酸配列を配列番号 : 2 に示す。

マウス LKB1 ゲノム DNA は以下のようにしてクローニングした。

ドイツヒトゲノムプロジェクトリソースセンター(RZPD)より、マウス(129/0la ストレイン)ゲノム DNA ライブライバーをグリッドしたフィルターを購入した。このライブライバーは以下の特徴を有する。

ゲノム DNA : 129/0la マウスの脾臓細胞より調製した DNA。Mbo I によるパーシャル切断。

ベクター：コスミドベクターlawrist 7。

ヒト LKB1 cDNA をプローブとし、通常の条件でこのフィルターに対してハイブリダイゼーションと洗浄を行った。その結果、2つのクローン、P2436Q3 (クローン 243) 及び L07209Q3 (クローン 072) において陽性シグナルが認められた。これらのクローンを RZPD から購入し、さらに PCR によってマウス LKB1 遺伝子を含んでいることを確認した。すなわち、これらのコスミドクローンを保持する大腸菌を $30\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを含む LB 培地で培養し、QIAGEN maxi キット (Qiaegen) を用いたアルカリ SDS 法によりコスミド DNA を調製した。コスミド DNA を鋳型とし、DJ666 プライマー (5' GGTGATGGAGTACTGCGTGTG 3' : 配列番号 : 7) 及び MPJ 18 プライマー (5' GGTGAAGTCTCCTCTCCAATGTT 3' : 配列番号 : 8) を用いた PCR を行い、マウス LKB1 遺伝子の断片が増幅されることを確認した。

これらのコスミド DNA から、マウス LKB1 cDNA の配列などをもとに作製したプライマーを用いた PCR によりマウス LKB1 遺伝子をいくつかの断片に分けて増幅し、それらを直接シークエンシングすることにより塩基配列を決定した。得られたゲノム DNA 配列を cDNA の配列と比較することにより、エキソン／イントロン構造を決定した。その結果、両クローンともイントロン 1 の途中からエキソン 10 までを含んでおり、クローン 072 の方が数 kbp 長いイントロン 1 を含んでいることが明らかとなった (図 1)。次に、イントロン 1 内に作製した MPJ67 プライマー (5' A CTGCAGCTGACCCAAGCCAGGAT 3' : 配列番号 : 9) とマウス LKB1 cDNA の 5' 非翻訳領域 (UTR) 中に作製した MPJ13 プライマー (5' CGAAGGACAGAGGACAAAGAGTGG 3' : 配列番号 : 10) を用い、マウスゲノム DNA を鋳型とした PCR を行い、残りのイントロン 1 と、エキソン 1 を含む断片をクローニングした。以上の様にして、マウス LKB1 ゲノム DNA のエキソン 1 からエキソン 10 のクローニングを行った。マウス LKB1 遺伝子のエキソン／イントロン構造を図 1 に模式的に示す。また、エキソン 2 からエキソン 10 までの塩基配列を配列番号 : 3 に示す。この塩基配列を、エキソン部分を大文字で、イントロン部分を小文字で表したものを、図 2、3、4 に示

す。

B. 相同組み換え用ベクターの構築

クローン 072 コスミド DNA に含まれるマウス LKB1 遺伝子を、HindIII サイトによって分割される 4 つの断片（断片 1～4、図 1）に分けてそれぞれプラスミドベクターにサブクローニングを行った。すなわち、まずクローン 072 コスミド DNA を SfiI で切断し、この切断末端を TaKaRa DNA blunting kit(TaKaRa)を用いた方法により平滑末端化した。これをさらに HindIII で切断し、生じた約 8 kbp の断片（断片 1）を pBluescript II ベクター(TOYOB0)の SmaI/HindIII サイトに組み込み、クローン MGF-10 を得た。また、クローン 072 コスミド DNA を HindIII によって切断し、生じた約 1 kbp の 2 つの断片（断片 3、断片 4）、及び約 4 kbp の断片（断片 2）をそれぞれ pUC18 ベクター(Pharmacia)の HindIII サイトに組み込み、クローン MGG-1（断片 2）、クローン MGD-2（断片 3）、及びクローン MGD-3（断片 4）を得た。

これらのサブクローンから以下のようにして相同組み換え用のベクターを構築した。まず、クローン MGF-10 から NotI/XhoI によって切り出される断片 1 を、ジフテリア毒素 A 遺伝子、及び mRNA 不安定化配列(A+T)を持つプラスミド(DT-A カセット B、Yagi, T et al. Analytical Biochemistry 214:77-86, 1993)の NotI/XhoI サイトに挿入し、クローン LT1 を得た。クローン MGG-1 の AvaIII とベクター中の EcoRI サイトの間に F23 合成リンカー（図 6）（上段：配列番号：1 1、下段：配列番号：1 2）を挿入し、クローン LT2 を得た。LT2 から HindIII/ClaI で切り出される断片（断片 2）をクローン LT1 の HindIII/ClaI サイトに挿入し、LT4 を得た。pBluescript II ベクターの SpeI/XhoI サイトに loxP2 合成リンカー（図 6）（上段：配列番号：1 3、下段：配列番号：1 4）を挿入したクローン loxP2 を作製し、この EcoRI/BamHI サイトに polyA 添加シグナルを持たないネオマイシン耐性遺伝子を組み込み、両側を 2 つの loxP 配列に挟まれたネオマイシン耐性遺伝子のカセット、クローン loxP2/neo-を得た。このクローンから HindIII により

ネオマイシン耐性遺伝子を切り出し、LT4 の断片 1 と断片 2 の間（イントロン 1）の HindIII サイトに挿入し、クローン LT-5 を得た。クローン MGD-2 を鋳型とし、LOXP3 A1 プライマー (5' GATGTTCCACCTCGAGCCCAGGCTCCAGAGGTCACT 3' : 配列番号：15) 及び LOXP3 S3 プライマー (5' GATCTCGAGATCGATGGTACCGGTGTTCCACATAACCTCGTATAGCATACATTACGAAGTTATCTGTCCACTGTGTCTGCAGGT 3' : 配列番号：16) を用いた PCR により、断片 3 の 5' 側に loxP 配列と XhoI/ClaI/KpnI/Cfr10I サイトを付加した断片を増幅し、これを pBluescript II ベクターの XhoI サイトに挿入し、クローン LT3 を得た。最後に、クローン LT3 より 5' 側に loxP 配列を持つ断片 3 を ClaI/XhoI によって切り出し、クローン LT5 中の断片 2 の 3' 側の ClaI/XhoI サイトに挿入することにより相同組み換え用ベクター LT6 を得た。

このベクターは以下の特徴を持つ（図 7）。

- (i) 第 1 イントロンに、loxP 配列を両端に持つネオマイシン耐性遺伝子が、そして第 8 イントロン中にはもう一つの loxP 配列が挿入されている。
- (ii) 第 8 イントロン中に挿入された loxP 配列には KpnI サイトが付加されており、このベクター由来の変異アリルをサザンプロットで見分けることができる。
- (iii) ネガティブ選択用マーカー遺伝子としてジフテリア毒素 A 遺伝子を持つ。
- (iv) 野生型 LKB1 遺伝子との相同部分は、ネオマイシン耐性遺伝子の上流が約 7 kb、ネオマイシン耐性遺伝子から第 8 イントロンの loxP 配列までが約 4 kb、そして第 8 イントロンの loxP 配列から下流が約 0.9 kb である。

〔実施例 2〕 相同組み換えによる変異 LKB1 遺伝子を持つ ES 細胞の樹立

本実施例では、相同組み換え用ベクターを、エレクトロポレーション法によりマウス ES 細胞 AB2.2-Prime ES Cells (LEXICON 社 The Mouse Kit) に導入し、次いで G418 により選択培養を行った。得られた G418 耐性コロニーについて、PCR およびサザンプロットにより相同組み換え体の検定を行った。以下、具体的に説明する。

相同組み換え用ベクター (LT6) DNA 60 μg を NotI で切断することにより線状

化し、精製した。この DNA をマウス ES 細胞 AB2.2-Prime ES Cells (LEXICON 社 The Mouse Kit) 3×10^7 個を含むエレクトロポレーション用緩衝液 (LEXICON 社 The Mouse Kit ESQ PBS) に懸濁し、Field Strength 575V/cm、Capacitance 500 μ F の条件で、遺伝子導入を行った。導入後 24 時間から終濃度 300 μ g/ml の G418 (Genetisin, Sigma) で選択培養を行った。

ES 細胞の培養には、ダルベッコ修正イーグル培養液 (GIBCO DMEM 11965-092) に終濃度 15% の牛胎児血清 (FBS)、終濃度 2mM の L-グルタミン (GIBCO 25030-081)、終濃度 50U/ml のベニシリンと終濃度 50 μ g/ml のストレプトマイシンを添加した ES 細胞用培地を用いた。

また、ES 細胞用のフィーダー細胞としては ESQ Feeder cells (LEXICON 社 The Mouse Kit) を用い、培養液は ESQ DMEM に終濃度 7% の FBS を添加したものを用いた。ESQ Feeder cells (5×10^7 細胞/バイアル) を、37°Cで急速融解後、フィーダー用培地で細胞数 4.4×10^5 cells/ml に調整し、あらかじめゼラチンコート (LEXICON 社 The Mouse Kit ESQ Gelatin) した培養器に、100mm ϕ ディッシュの場合は 12ml、60mm ϕ ディッシュの場合は 4ml、6 穴プレートの場合は 2ml/穴、24 穴プレートの場合は 0.5ml/穴、そして 96 穴プレートの場合は 75 μ l/穴ずつ分注した。以上のように作製したフィーダー細胞は 3 週間以内に使用した。

遺伝子導入後 11 日目から、以下のようにして、出現した G418 耐性コロニーを 96 穴のマイクロプレートに継代した。すなわち、マイクロピベットを用いて G418 耐性コロニーを 30 μ l の TE (Gibco Trypsin-EDTA 25200-072) 溶液を含む 96 穴のマイクロプレート (Corning 25860MP) に移し換え、数分間処理した後、70 μ l の ES 細胞培養用培地を加え、ピベティングすることによって単一細胞にした。この細胞懸濁液を 96 穴のマイクロプレート (Falcon 3072) に移し換え培養を継続した。3 日後、96 穴のマイクロプレート上の細胞がコンフルエントに達した段階で、以下のようにして細胞を 2 つに分割した。すなわち、細胞に TE を 25 μ l 加え分散させ、ES 細胞用培地を 25 μ l 加えピベティングすることによって単一細

胞にした後、2×Freezing medium (LEXICON 社 The Mouse Kit ESQ DMEM:ESQ FBS: DMSO=2:2:1) を 50 μ l 加え、その 20 μ l を ES 細胞用培地 150 μ l の入ったゼラチンコートした 96 穴マイクロプレート (Iwaki 4860-020) に継代し、PCR による相同組み換え体検定用の DNA を抽出するために培養した。残りの ES 細胞には、流動パラフィン 100 μ l. (0.2 μ m のフィルターで濾過滅菌したもの) を加え、-80°C で凍結保存した。尚、DNA 抽出用の ES 細胞の培養にはフィーダー細胞は用いず、その他の ES 細胞の培養には全てフィーダー細胞を用いて行った。相同組み換え体の検定は、PCR によって以下の通りに行った。すなわち、コンフルエントの状態まで細胞が増殖した 96 穴プレートの各ウェルから培地を取り除き、Lysis buffer (10x Taq buffer 5 μ l、5% NP-40 5 μ l、Proteinase K 4 μ l、H₂O 36 μ l)を加え、55°C で 2 時間加温した。溶解したサンプルを 0.5ml チューブに回収し、95°C で 15 分間処理した後 10,000rpm で 10~15 分間遠心し、その上清 1 μ l を PCR 用の鋳型 DNA として用いた。

PCR のプライマーは、相同組み換え用ベクター上の 3' 側の loxP と、相同組み換え用ベクターに含まれないエキソン 10 との間、約 2.1kb が増幅されるように設計した。

すなわち、第 8 イントロンに挿入した loxP 配列を含む LOXP3 S2 プライマー (5' CCGGTGTTCCACATAACTTC 3' : 配列番号 : 17) 及び第 10 エキソンに位置する MP J37 プライマー (5' GTTCCCAAGCTTATTATTGCC 3' : 配列番号 : 18) を用いて、以下の条件で PCR を行った。

反応液組成

10 x ExTaq バッファー (TaKaRa) 5 μ l

2.5mM dNTPs 4 μ l

ExTaq (TaKaRa) 0.5 μ l

20 μ M LOXP3 S2 プライマー 1 μ l

20 μ M MPJ37 プライマー 1 μ l

サンプル 1 μ l

H₂O 37.5 μ l

反応条件

94°C、2 分 → (94°C、30 秒 → 68°C、4 分) × 36 サイクル → 72°C、10 分

PCR の結果から相同組み換え体であると考えられたクローンについては、さらにサザンプロットによる確認を行った。すなわち、ES 細胞から調製したゲノム DNA を制限酵素 KpnI で消化し、0.8%アガロース電気泳動後 Hybond N+ポジティブチャージナイロンフィルター(Amersham)に転写し、第 9、10 エクソンを含む約 700bp の断片(プローブ 1)をプローブとし、ハイブリダイゼーションを行った。プローブ 1 は、クローン 072 コスミド DNA を鋳型とし、MPJ22 プライマー(5' CAGCAG CAAGGTGAAGCCAGAAGG 3' : 配列番号: 19)及び MPJ37 プライマー(配列番号: 18)(前出)を用いて PCR によって増幅して得た。ハイブリダイゼーションは ExpressHyb™ Hybridization solution(CLONTECH)を用い、メーカー推奨の方法に従って行った。相同組み換えを起こしたアリルは、loxP 配列に人工的に付加された KpnI サイトのため、野性型アリル由来のバンドよりも約 2.6kb 短いバンドとして検出され、このバンドの有無により相同組み換え体かどうかを判断した。相同組み換え体クローンは、調べた G418 耐性クローン 562 個中 4 個(クローン 236、クローン 256、クローン 260、クローン 358)であった。

尚、PCR の検査成績とサザンプロット解析による成績は完全に一致した(図 8)。

PCR 及びサザンプロット解析で相同組み換えが確認されたクローンは、凍結保存してあった 96 穴プレートを 37°C に温めることにより融解し、24 穴プレートに継代した。この 24 穴プレートを 24 時間、37°C で培養後、DMSO と流動パラフィンを除くために培地を交換した。それぞれのクローンが 75~90% コンフルエントに

達した時点で 24 穴から 6 穴プレートに継代した。さらに、6 穴プレートに 75~90% コンフルエントまで増殖したものが 2 穴分得られたところで、1 穴分は凍結保存し、残りの 1 穴分は胚盤胞への注入及び DNA 抽出に使用した。

凍結保存は以下の如く行った。すなわち、細胞を ESQ PBS で 2 回リーンスした後、0.5ml の ESQ Trypsin (LEXICON 社 The Mouse Kit) を加え、37°C で 15~20 分間保温しトリプシン処理を行った後、さらに 0.5ml の ES Cell medium を加え、35~40 回ビベッティングを行い ES 細胞の塊を完全に解離させた。この細胞懸濁液を 1 5ml 遠心チューブに移し、さらに 1ml の ES Cell Medium でウェルを洗ってチューブに回収した。チューブを 1,000rpm で 7 分間遠心し、培地を取り除き 0.25ml ES Cell Medium に再懸濁し、0.25ml の 2 x Freezing medium を加えた。クライオジェニックバイアルにウェルの中身を移し、-80°C で凍らせ、液体窒素中で保存した。

胚盤胞への注入及び DNA 抽出用の細胞は、ES 細胞の塊を完全に解離させた後、その四分の一を胚盤胞への注入に用い、残りの細胞の三分の一、及び三分の二をそれぞれゼラチンコートした 60mm ディッシュに継代した。前者は細胞がコンフルエントにまで増殖したところでササンプロット解析用のゲノム DNA を抽出し、後者の細胞はコンフルエントにまで増殖したところで 3 本に分けて凍結した。

[実施例 3] 組み換え LKB1 遺伝子を持つ ES 細胞によるキメラマウスの作製
相同組み換えが確認された ES 細胞クローンについて、C57BL/6J 系マウスの胚盤胞をホスト胚としてキメラ胚を作製し、それを偽妊娠マウスの子宮角に移植して産仔を得た。ホスト胚の採取は、妊娠 2 日目に、100 μM EDTA を添加した Whitten's 培地で、卵管と子宮を灌流することによって行った。8 細胞期胚または桑実胚を 24 時間 Whitten's 培地で培養し、得られた胚盤胞を注入に用いた。注入に用いた ES 細胞は、継代してから 2 あるいは 3 日目に TE 処理により分散させ、顕微操作に供するまで 4°C で静置した。

ES 細胞の注入用ピベットとしては、Cook IVF 社製の polar body extrusion pi

pette (内径約 20 μm) を用いた。胚保定用ピベットとしては、外径 1mm の微小ガラス管 (NARISHIGE) を微小電極作製器 (Sutter 社 P-98/IVF) を用いて細く引き延ばした後、マイクロフォージ (De Fonburun) を用いて外径 50~100 μm の部分で切断し、さらに口径を 10~20 μm に加工したものを用いた。

注入用ピベットと保定用ピベットは、先端から約 5mm の部分を約 30 度曲げて、マイクロマニピュレーター (LEITZ) に接続した。顕微操作に用いたチャンバーとしては、穴あきスライドグラスにカバーガラスを蜜蠟で接着したものを用い、その上に約 20 μl の 0.3% BSA を加えた Hepes-buffered Whitten's 培地のドロップを 2 個置き、上面を流動パラフィン (ナカライトスク 261-37 SP) で覆った。一方のドロップには、約 100 個の ES 細胞を入れ、他方には拡張胚盤胞を 10~15 個入れ、胚 1 個あたり 10~15 個の ES 細胞を注入した。

顕微操作はすべて、倒立顕微鏡下で行った。操作胚は、1~2 時間の培養後、偽妊娠 2 日目の ICR 系受容雌の子宮角に移植した。分娩予定日に至っても産仔を娩出しなかった受容雌については、帝王切開を施し、里親に保育させた。

C57BL/6J 系マウスの胚盤胞 59 個に、クローン 358 ES 細胞を注入した結果、55 個が生存した (成功率 93%)。この 55 個を偽妊娠 2 日目の ICR 系受容雌の子宮角に移植した結果、28 匹の産仔が得られた。相同組み換え体に由来する部分の毛色は野生色を呈し、C57BL/6J 系マウスに由来する部分の毛色はブラック色を呈する。得られた 28 匹の産仔のうち、毛色からキメラマウスと判定できたのは 23 匹であり、そのうちの 21 匹が形態的に雄を示していた。これらのキメラマウスにおける毛色から判断した ES 細胞の寄与率は 20~100% の幅であり、寄与率が 60% 未満のものが 2 例、60% 以上 90% 未満のものが 4 例、90% 以上のものが 15 例であった。同様に、クローン 236 ES 細胞及びクローン 256 ES 細胞からもキメラマウスが得られた。これらのキメラマウス作出に関する成績を表 1 に示した。

表 1

ESクローナー	ホスト胚系統	注入胚/操作胚数	%	移植胚数	着床数	%	産仔数			毛色キメラ数			寄与率		
							Total (%)	♂	♀	Total (%)	♂	♀	Total (%)	♂	♀
236	B6	70 / 74	95%	70	46	66%	24	34%	17	7	12	50%	10	2	♂90%以上6匹、90%未満～60%以上2匹、60%未満2匹、♀10%未満2匹
256	B6	57 / 58	98%	57	44	77%	20	39%	11	9	4	18%	4	0	♂90%以上3匹、90%未満～60%以上1匹、60%未満2匹
260	B6	40 / 45	89%	40	13	33%	5	13%	4	1	0	0%	—	—	
358	B6	55 / 59	93%	55	—	—	28	51%	22	6	23	82%	21	2	♂90%以上15匹、90%未満～60%以上4匹、60%未満2匹、♀60%未満2匹

[実施例4] 相同組み換え体の生殖系列への伝達の検定

実施例3のキメラマウスをC57BL/6J系マウスと交配させ、ES細胞由来の産仔が得られるか否かを検定した。キメラマウスの生殖細胞がES細胞に由来していれば、娩出される産仔の毛色は、野性色を呈し、C57BL/6J系マウスの胚盤胞に由来していればブラック色を呈することとなる。

クローン358 ES細胞については、性成熟に達する前に死亡した5例を除いた16例 (No.358-1~16) のキメラマウスのうち、6例 (No. 358-1、2、5、7、8、13)において、ES細胞の生殖系列への伝達が確認された。野性色を示した産仔数／得られた産仔数は、それぞれ、7/9、2/2、3/14、8/8、5/16、2/11であった。またクローン256 ES細胞についても、4例 (No. 256-1~4) のキメラマウスのうち2例 (No. 256-1、2)においてES細胞の生殖系列への伝達が確認された。野性色を示した産仔数／得られた産仔数は、それぞれ、2/3と1/13であった。

次に、これらの野性色マウスのうち27匹について尾の一部からDNAを抽出し、PCR及びサザンプロットにより、変異LKB1アリルが伝達されているかを調べた。その結果、クローン358 ES細胞由来の産仔は10例において、そしてクローン256 ES細胞由来の産仔では1例において変異LKB1アリルが伝達されていることが確認された(図9)。

以上述べた変異アリル伝達の成績を表2に示した。

表 2

変異アリル伝達の成績表

キメラマウス No.	ESクローン	産仔数	毛色	陽性数	
				PCR	サザンプロット
358-1	358	9	7	0	-
358-2	358	2	2	2	2
358-3	358	6	0	-	-
358-4	358	3	0	-	-
358-5	358	14	3	0	-
358-6	358	14	0	-	-
358-7	358	8	8	3	3
358-8	358	16	5	5	5
358-9	358	1	0	-	-
358-10	358	8	0	-	-
358-11	358	-	-	-	-
358-12	358	6	-	-	-
358-13	358	11	2	-	-
358-14	358	-	-	-	-
358-15	358	-	-	-	-
358-16	358	-	-	-	-
256-1	256	3	2	1	1
256-2	256	13	1	0	-
256-3	256	7	0	-	-
256-4	256	-	-	-	-
総計		121	30	11	11

[実施例 5] Cre-loxP システムによる LKB1 遺伝子の失活

Cre 遺伝子を一過性に ES 細胞内で発現させることにより、コンベンショナルな遺伝子欠失と、コンディショナルな遺伝子欠失の両タイプの ES 細胞を作製できる (Taniguchi, M et al. Nucleic Acids Research 26:679-680, 1998)。コンディショナルなタイプ (タイプ 2、図 5) の ES 細胞由来の個体は野生型の表現型を示すが、Cre 遺伝子を発現させることにより LKB1 遺伝子を失活させることができる。

また、このシステムを利用することにより、組織特異的、あるいは時期特異的に発現を制御できるプロモーターで Cre の発現を制御したトランスジェニックマウスと交配したり、Cre 遺伝子を発現するように構築したアデノウイルスなどを感染させることにより、Cre 遺伝子が発現している細胞において特異的に loxP 配列に挟まれた LKB1 遺伝子のエクソン 2 から 8 に渡る領域を欠失させ、LKB1 遺伝子の機能を欠損させることができる。このように Cre-loxP システムにおいては、Cre 遺伝子を発現させることにより、ES 細胞、マウス個体、あるいはマウス受精卵において、時期特異的、あるいは組織特異的に loxP 配列によって挟まれた遺伝子を組み換えによって欠失させることが可能である。

【実施例 6】 Cre-loxP システムを利用した LKB1 遺伝子欠損マウスの作製とその表現型

ES 細胞の変異 LKB1 アリルが伝達されていることが確認されたクローン 358 雄マウスの精子と、C57BL/6J マウスの卵子とを体外受精法 (Toyoda Y et al, Jpn.J. Anim. Reprod. 1971;16:147-151) で受精させることにより得られた前核期卵 (この時点では図 10 の組み換えアリルと記載された状態に LKB1 構造遺伝子はなっている) の前核に、Cre 遺伝子の発現が MC1 プロモーターによって制御された pCre-pac プラスミド (Taniguchi M et al, Nucleic Acids Res 1998;26(2):679-680) を環状な状態で注入した (Araki K et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995;92:160-164)。注入は、86 個の受精卵を行い、そのうちの 75 個が注入後も生存していた。その後、受精卵を 24 時間 100 μ M EDTA を添加した Whitten's 培地で培養し、2 細胞期に発生した 61 個を、偽妊娠 0.5 日目の ICR 受容雌の卵管に移植した。12 例の産仔が得られ、全例が離乳まで至った。離乳したマウスの尾の一部から DNA を抽出し、PCR 法により、LKB1 遺伝子の loxP 配列に挟まれたエクソン 2 から 8 に渡る領域が欠損している個体の選別を行った。PCR は以下のとく行った。

プライマーセット

- 25 -

A セット： MPJ69 プライマー (5' CCTTTGGCTGCTGGGTGACTTCTG 3' :配列番号：20)
と MPJ37 プライマー (配列番号：18)

B セット： MPJ69 プライマー (配列番号：20) と MPJ56 プライマー (5' ACAGAG
CTCTCCAAGGGAGA 3' :配列番号：21)

反応組成液

10 x ExTaq バッファー (TaKaRa) 5μl

2.5mM dNTPs 4μl

ExTaq (TaKaRa) 0.5μl

抗 Taq 抗体 (CLONTECH) 0.5μl

20μM フォワードプライマー 1μl

20μM リバースプライマー 1μl

サンプル 1μl

H₂O 37μl

反応条件

94°C、2 分 → (94°C、30 秒 → 68°C、3 分) × 35 サイクル → 72°C、10 分

A セットのプライマーセットで PCR を行ったところ、約 2.1 kbp のバンドが一部のマウスに現れた (図 11 A)。このバンドのサイズは loxP 配列に挟まれたエキソン 2 から 8 までの領域が欠失した場合に現れることが予想されるサイズである (図 10)。これらのマウスをヌルアリルを持つ個体であると判断し以下の解析に用いた。ヌルアリルを持つ雄マウス (ヘテロ欠損) の精子と、C57BL/6J 雌マウスの卵子とを体外受精法により受精させ、得られた受精卵を偽妊娠 0.5 日目の ICR の卵管に移植し、産仔 (F1) を得た。F1 マウスの尾から抽出したゲノム DNA をサンプルとし、B セットのプライマーセットによる PCR を行うことにより、ヌルアリルが伝

達されたヘテロ欠損マウスを選択した(図 11 B)。B セットのプライマーを用いた場合、ヌルアリルからは約 1.2 kbp のサイズを持つバンドが増幅されることが予想されるため(図 10)、このサイズのバンドが現れたマウスをヌルアリルが伝達された個体であると判断した。一部のサンプルについては、この 1.2 kbp のバンドを直接シークエンシングすることにより、これが予想通りに欠失が起きたヌルアリルから由来するバンドであることを確認した。次に、ヌルアリルをホモで持つ F2 マウスを作出するために、F1 ヘテロ欠損マウスの精子と卵子を用いた体外受精を行った。受精卵を偽妊娠雌に移植することにより得られた F2 マウスの遺伝子型をサザンプロット法により解析した。マウスの尾から抽出したゲノム DNA を BamHI で消化後、イントロン 8 の一部に相当するプローブ 7(図 10)をプローブとしハイブリダイゼーションを行った。プローブ 7 は相同組み換え用ベクター(LT6)を鋳型とし、LOXP3 S2 プライマー(配列番号: 17)と MPJ60 プライマー(5' CTC TCCCAAACCCCTCTGACT 3' : 配列番号: 22)を用いた PCR により増幅して得た。ハイブリダイゼーションは、ULTRAhybTM (Ambion) を用い、メーカー推奨の方法に従って行った。野性型アリルからはイントロン 7 とイントロン 8 に存在する BamHI サイトに挟まれた約 2 kbp のバンドが現れることが予想され、ヌルアリルからは、イントロン 7 中の BamHI サイトが存在しないため、イントロン 1 を含む 7 kbp 以上のバンドが現れることが予想される(図 10)。サザンプロット法による解析の結果の一部を図 11 C に示す。全てのサンプルに共通して野性型アリル由来のバンドが見られ、一部のサンプルにおいてはヌルアリル由来の大きいバンドが見られる。サザンプロット法による解析の結果、野性型アリルのホモ : ヌルアリルのヘテロ : ヌルアリルのホモマウスの比率はそれぞれ、55 : 90 : 0 であることが判明した。この結果から、LKB1 遺伝子の欠損したマウスは、胎仔期に致死になっていることが示された。すなわち、LKB1 遺伝子は胚発生にとって必須な分子であるものと考えられた。

産業上の利用の可能性

本発明により、LKB1 遺伝子の発現を人為的に抑制しうる、または抑制された哺乳動物が提供された。本発明の哺乳動物においては、Cre-loxP システムを利用することにより、LKB1 遺伝子を時期特異的、組織特異的に破壊することができ、従来の大きな問題点となっていた、目的遺伝子の欠失が胎性致死を招きその後の機能解析が不可能である場合においても、それを回避することが可能であると考えられる。本発明の哺乳動物は、ヒト PJS や、その他癌などの LKB1 遺伝子の欠損に基づく疾病的発症機構の解明、及び治療薬、治療法等の開発のためのツールとして非常に有用である。

請求の範囲

1. 内在性 LKB1 遺伝子の発現を人為的に抑制することができる非ヒト哺乳動物。
2. 内在性 LKB1 遺伝子の発現の抑制を、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部を欠損させることにより誘導する、請求項 1 に記載の非ヒト哺乳動物。
3. ゲノム上の LKB1 遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部が、少なくとも 1 組の loxP 配列により挟まれた構造を有する、請求項 1 または 2 に記載の非ヒト哺乳動物。
4. げっ歯類である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物。
5. マウスである、請求項 4 に記載の非ヒト哺乳動物。
6. LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されている非ヒト哺乳動物。
7. LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現が、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部の欠損により抑制されている、請求項 6 に記載の非ヒト哺乳動物。
8. げっ歯類である、請求項 6 または 7 に記載の非ヒト哺乳動物。
9. マウスである、請求項 8 に記載の非ヒト哺乳動物。
10. LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現の抑制を人為的に誘導することができ、かつ、個体へ分化させることが可能な非ヒト哺乳動物細胞。
11. LKB1 をコードする内在性遺伝子の発現の抑制を、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部を欠損させることにより誘導する、請求項 10 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。
12. ゲノム上の LKB1 遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部が、少なくとも 1 組の loxP 配列により挟まれた構造を有する、請求項 10 または 11 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

13. *Cre* 遺伝子を発現可能に保持している、請求項 12 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

14. げっ歯類細胞である、請求項 10 から 13 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞。

15. マウス細胞である、請求項 14 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

16. 胚性幹細胞である、請求項 10 から 15 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞。

17. *LKB1* をコードする内在性遺伝子の発現が人為的に抑制されており、かつ、個体へ分化させることが可能な非ヒト哺乳動物細胞。

18. *LKB1* をコードする内在性遺伝子の発現が、該遺伝子またはその発現制御領域の少なくとも一部の欠損により抑制されている、請求項 17 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

19. 請求項 12 に記載の非ヒト哺乳動物細胞において *Cre* 遺伝子を発現させることによって得られる、請求項 18 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

20. げっ歯類細胞である、請求項 17 から 19 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞。

21. マウス細胞である、請求項 20 に記載の非ヒト哺乳動物細胞。

22. 胚性幹細胞である、請求項 17 から 21 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物細胞。

23. 請求項 1 から 5 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

(a) 請求項 16 に記載の非ヒト哺乳動物細胞を、妊娠した雌から得た胚に挿入する工程、および

(b) 該胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法。

24. 請求項 6 から 9 のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

(a) 請求項 22 に記載の非ヒト哺乳動物細胞を、妊娠した雌から得た胚に挿入する工程、および

(b) 該胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法。

25. 請求項 7 に記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

(a) 請求項 3 に記載の非ヒト哺乳動物の受精卵または胚を提供する工程、

(b) 該受精卵または胚に Cre 遺伝子を導入し、発現させる工程、および

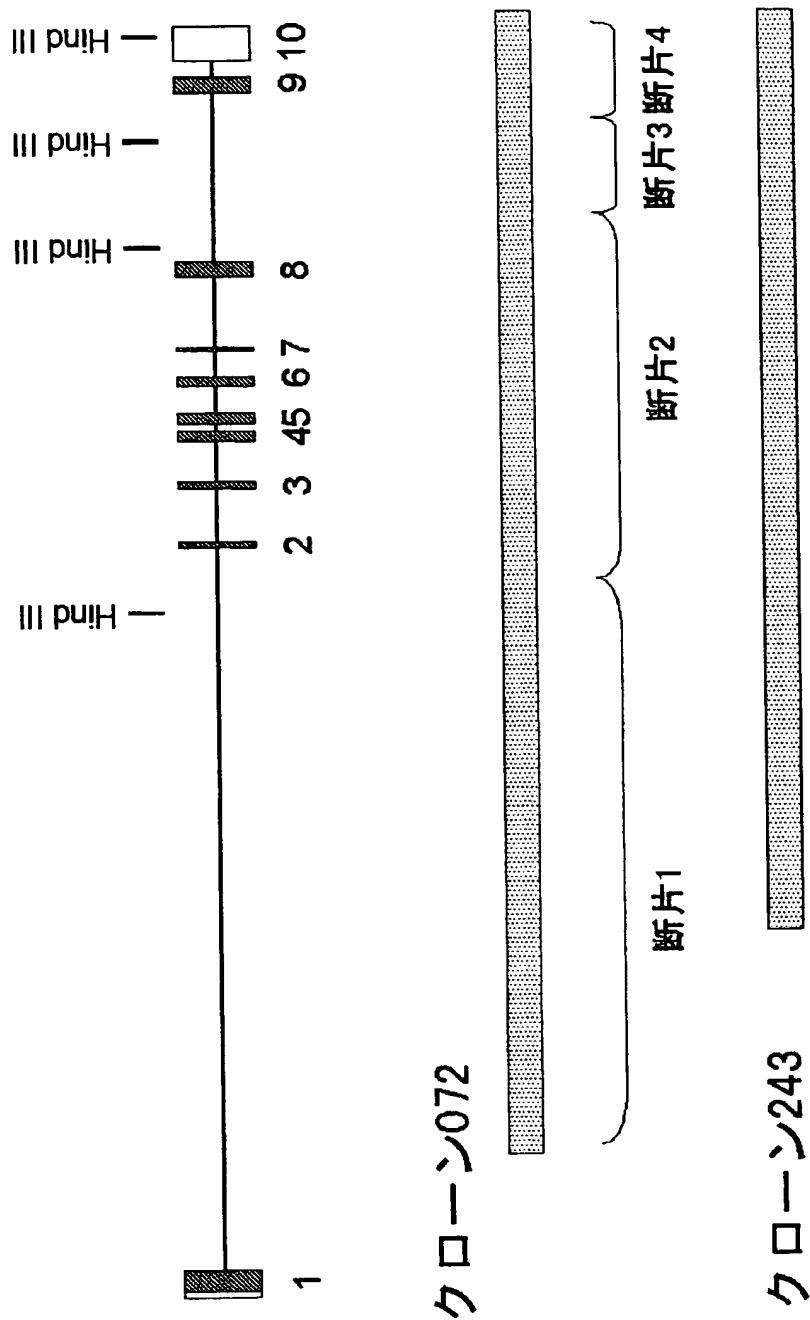
(c) 該受精卵または胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植する工程、を含む方法。

26. 請求項 7 に記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、請求項 3 に記載の非ヒト哺乳動物に、Cre 遺伝子を導入し、発現させる工程、を含む方法。

27. 請求項 7 に記載の非ヒト哺乳動物の作製方法であって、請求項 3 に記載の非ヒト哺乳動物を、Cre 遺伝子をゲノム上に有する非ヒト哺乳動物と交配させ、その後代を得る工程を含む方法。

1 / 1 1

図 1



2 / 1 1

図 2

GGAGATCCAGCTGCTGGCGGCTGCGGATCGGAATGTGATCCAGCTGTGGACGTGCTGTACAATGAGGAGAACAGA
AGATatatctgtgggtggagtggtggctgggtggccctgtgttagggctggaaagcctctgcacggccctggcagca
atagtgcatacatgtcatcctgtggcgtcagctcatcaggcagggagcaaggcatgggcttccacctggcagca
cctgtctgagcagtgtggctggactggcatggcctcagggacttgggctatgtacattgacaggccccggct
ggttctagagggttccatgtgcggcccttccagaggttagaggttgcacacgcacgttgcacgttgcagtcctgggagc
attctgagaaccaggccatgtccctgcaccccaactcctggtacccatctctccctgtggcttagtacaccagctgattcagt
cctgttgaatctatgtactccatgtggccaaagtcaactgtggcttgcacccatgtggcttagtgcacccatgtggagc
gcagaatggcgggagagcagactgggtggctgttggccagggccctccagaccactgttgcagggc
tcctggcttgggtgtctgccttgcacccatgtggcttagtgcacccatgtggcttagtgcacccatgtggagc
CTGGACAGTGTGGCGGAGAACGGCTTCCCTGTGCAAGCTCATGGgttagtgcacccatgtggcttagtgcacccatgtgg
attgtcaggaaaccagggtttctggcccccagtttaacccagccaaatgtgcacccatgtggcttagtgcacccatgtgg
ctgtggccctgcacccatgtggcttagtgcacccatgtggcttagtgcacccatgtggcttagtgcacccatgtgg
tggtagcagagaacaaaggaaagggaaagggaaagggaaagcaagccagagggaaacccatgtggctccctggcctggcagc
tgactgccagggtgcacccatgtggcttagtgcacccatgtggcttagtgcacccatgtggcttagtgcacccatgtgg
tcacccatgttaggcccagggttcatgacttcacccatgtggcttagtgcacccatgtggcttagtgcacccatgtgg
tgtggccctgcacccatgtggcttagtgcacccatgtggcttagtgcacccatgtggcttagtgcacccatgtgg
ATTGTTACAAGGACATCAAGCCGGCAACCTGCTACTCACCAACATGGCACACTCAAGATCTCCACCTCGGTGTGC
CGAGgttaggcacccatgtgcacccatgtggcttagtgcacccatgtggcttagtgcacccatgtggcttagtgcaccc
CCTTCGCTGTGGATGACACCTGCCGACAAGCCAGGGCTCCCGGCTTCCAGCCTCTGAGATTGCCAATGGACTGGA
CACCTTTCAGGTTCAAGGTGGACATCTGGTCAGCTGGGTACACTGtaagtgtcttgcacccatgtggcttag
ggggctgtgggtttccctagtgtttggccctttggccacagtggtggcttagtgcacccatgtggcttag
tgggtggcttcacccatccccactccacagggtttgcacacagatgttagtgcacccatgtggcttag
tcaccaggtaacatgttcctgtggagttggggcactctggcttgcacccatgtggcttag
tcctatgtgaagTTACAACATCACCAACGGGCTGTACCCATTGAGGGGACAATATCTACAAGCTTTGAGAACATTG
GGAGAGGAGACTCACCATCCCTGTGACTGCCGCCACACTCTGACCTACTCCGAGtggcatctaaatcacc
caaatgttaggacacggacagagccctggctggagggttgcacccatgtggcttagtgcacccatgtggcttag
ggatgggagggttgcagattgtttcccccacatgtggccgggtgggtgggttcacccatgtggcttag
aaggccaaaggggatggatgttagtggctgttagcacaacggcaggcacctgcacactcaacttatcttc
caggGGATGTTGGACTATGACCCGGCCAAGAGGTTCTCCATCCGACAGATTAGGCAGCACAGgtggcatggcc
ctcagccctgtgggttcacccatgtggctgggtgggtgggttcacccatgtggcttag
gttattgtgtggaaaggctgtgtgttagtgcacccatgtggcttagtgcacccatgtggcttag
tttgcaggatgtggcttagtgcacccatgtggcttagtgcacccatgtggcttag
ggtggggaggaggtagatgggaagtgactttggatccacgttgcacccatgtggcatgg
gaaatgtgt

図 3

tagggaggccaacaggaagcgtgaggcatggtgtcttcctcacctgaggctaagagcctctggtaacagtggagcct
ctgtcctcccttggttataccagctggtagagcccttgggtccaggctctgtctcttccctcatgttag
actgagactggctcagctgggtgtcccccagttagggcttctagctatccgtttcaaggcgggtggactatagggtc
agggacactgattgcccaccctagtccaaggcgtgtgtcatcagtgggtgggttgtccactgtatgggt
taggctacctaaggcctgttagccggagcaactaaggcctgtttatgttaaggacagccatggtgtgggttggta
ttggccagccgtggcacagtgcctggcacctgtgtgtgtgcacttggcccttttagCTGGTTCCGGAAAGAAACA
CCCTCTGGCTGAGGCCTCGTACCTATCCCACCAAGCCCAGACACTAAGGACCGCTGGCGAGTATGACTGTAGTGCCT
ACCTGGAGGACCTGCATGGCCGTGGAGGAGGAGGAGGAAGACTTGTGACATTGAGGACGGCATTATCTACACC
CAGGACTTCACAGTGCCTGgtaaagctggcttggcgagcttactggagctggtaacttgcactctgggtggc
ccctcccaagtctccagccactaacatgagccaccaggactccaaagccatctgtggctgtgcatttactctg
ggctagatgaagggctccctggctcatctagcaggaggagggaaaccctggagggcagtggtagggccctgagacag
ccacctggggagggtccagtggccctggcttgcacccatgtcccttgccttgcatttgcagggtgtcaggag
gccccggaggcagggttagcgaggatgcacatgcattggaaagggcaggcgcaggcccttgcaggag
gccccggagggtttgggttttagtgcacttgccttgcactaccctgacaggctccaccagggttgcaggag
tgttgcagggtggatgttgcctggcacttgccttgcactaccctgacaggctccaccagggttgcaggag
cctgggttcaaggcctgagctaggcttcactggccatgtggccagggttgcactaccctgacaggctccaccagg
cctgcattgcctggcacttgccttcaaaatagcttgccttgccttgccttgcatttgcagggttgcacttgc
ctgttagcaattgagacttcaatagcgtggccgtggccagggttgcactaccctgacaggctccaccagg
cagtatggccctggccacagcccttcaaggtaaaagcatccctatgtggaaatagtgttctactctgtc
gagcccttgcactgtccacaggctggctccggctgagactggcttgcacttgccttgcacttgc
tgctgggttgcattggggacttgcacttgccttgcactaccctgacaggctccaccagggttgcagg
cccttgcattggggacttgcacttgccttgcactaccctgacaggctccaccagggttgcacttgc
tgagggtcggactctgcaggcaacaggcagggttgcactaccctgacaggctccaccagg
gagttccacccactcaaggccatgtccatgcaggactggccagggttgcactaccctgacagg
tggagagaaaattctggatccaggagcgtggcactggctgtgtctgggttccacaggccatgtcc
tgtggagttacatgttagacactgtccatgtggccgtggccagggttgcactaccctgacagg
ggccaaacagagcaagctggctgcaggccatgtggatgttgccttccggctcatgc
ccgaatgcctcatctccttgcctgtacttgcactaccctgacaggcttgcactaccctgacagg
gcccaggcttgcacttgccttgcactaccctgacaggcttgcactaccctgacagg
tgccttgcacttgccttgcactaccctgacaggcttgcactaccctgacagg
tggccctgggttttgcactaccctgacaggcttgcactaccctgacagg
GAAGTGGGTCAAGATGGACAGAGCCACAGTTGCCCAAGGCTGTTGTGAATGGCACAGAGCCCCAGCTCAGCAGCAA
GGTGAAGCCAGAAGGCCGACCTGGCACCGCCAACCCCTGCCGCAAGGTGTGCTCCAGCAACAAGATCCGGCTCTCGG
CCTGCAAGCAGCAGTGACTGAGGCCTACAGgtggcatggccctggccaggccatccctgg
gctggctcttagctccctccgttagggcactgtcaagggggaaaggcttgc
catttaccaacagTGTGTATCAGGATCTCTGGGCAGGTGTCCCTGCAAGGCTGGGTTTCCAGGCCTGCCTGTCCACT

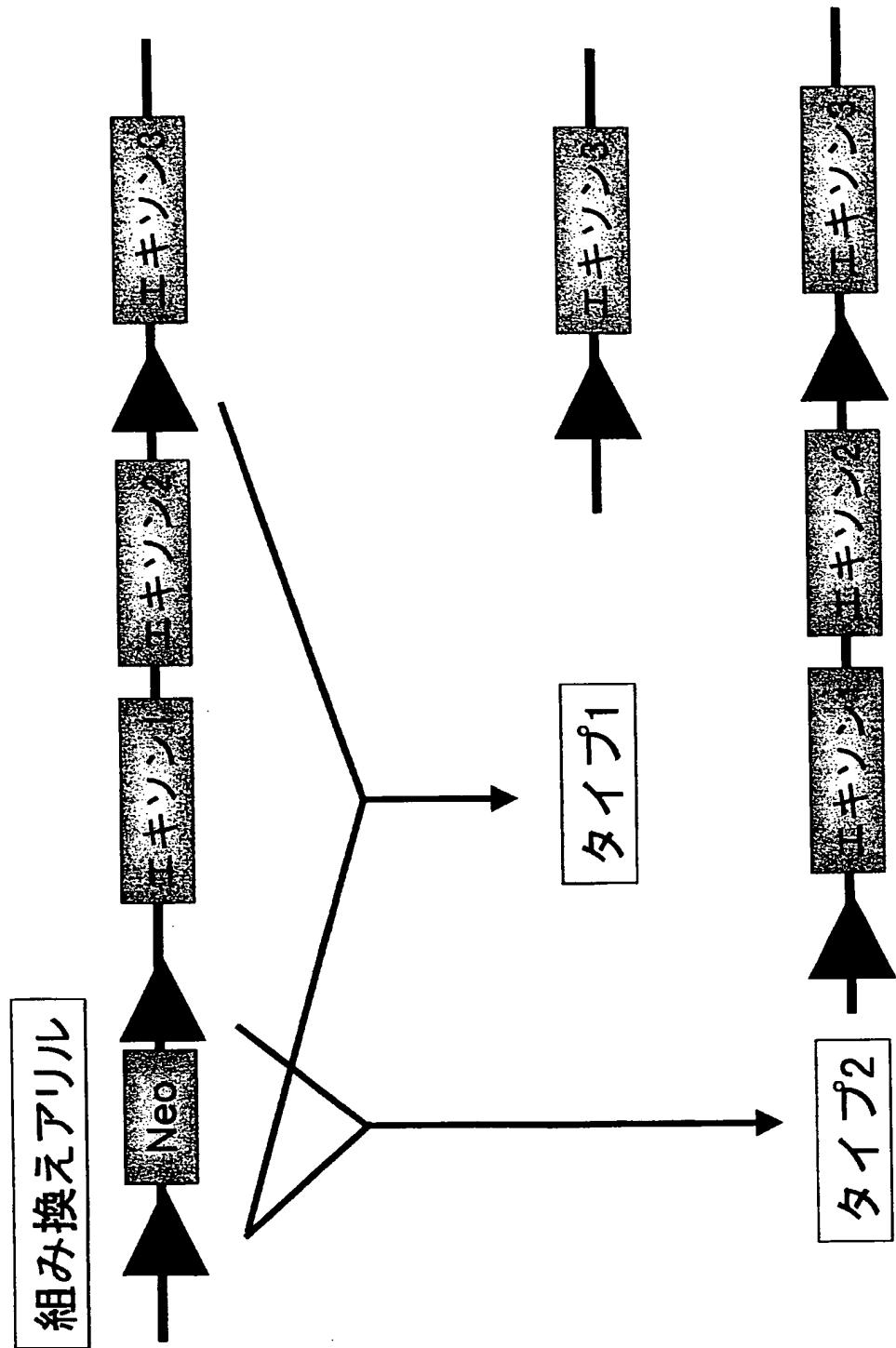
4 / 1 1

図 4

CACTTCGGACGTTGGAGCCGAGGGCGGACCTGCTGCCAGAACACTTATGTCGAGACCCTGGCCGGCTTGCCTG
CATGCCGCCCCGCGAGCCTCGCTGTCTTGGGTTGGTTTTAATAAAACAGGTGGATTGAGCTATGGCTAT
GAGGGTGTGGAAATATGGAGCAGGCGGGCACAGGGTGGCCTGCAGAGAAAACCCAGCAAACAAATATGCAGAGAC
ATTTATGATTAACCAGACAACGACCAACCACAGAGGGCGCAGGGCAGGGACTCACAGCAGTCTGCC
CTATCTTGGCAATAAAAGCTTGGAAACTTG

5 / 1 1

図 5



6 / 1 1

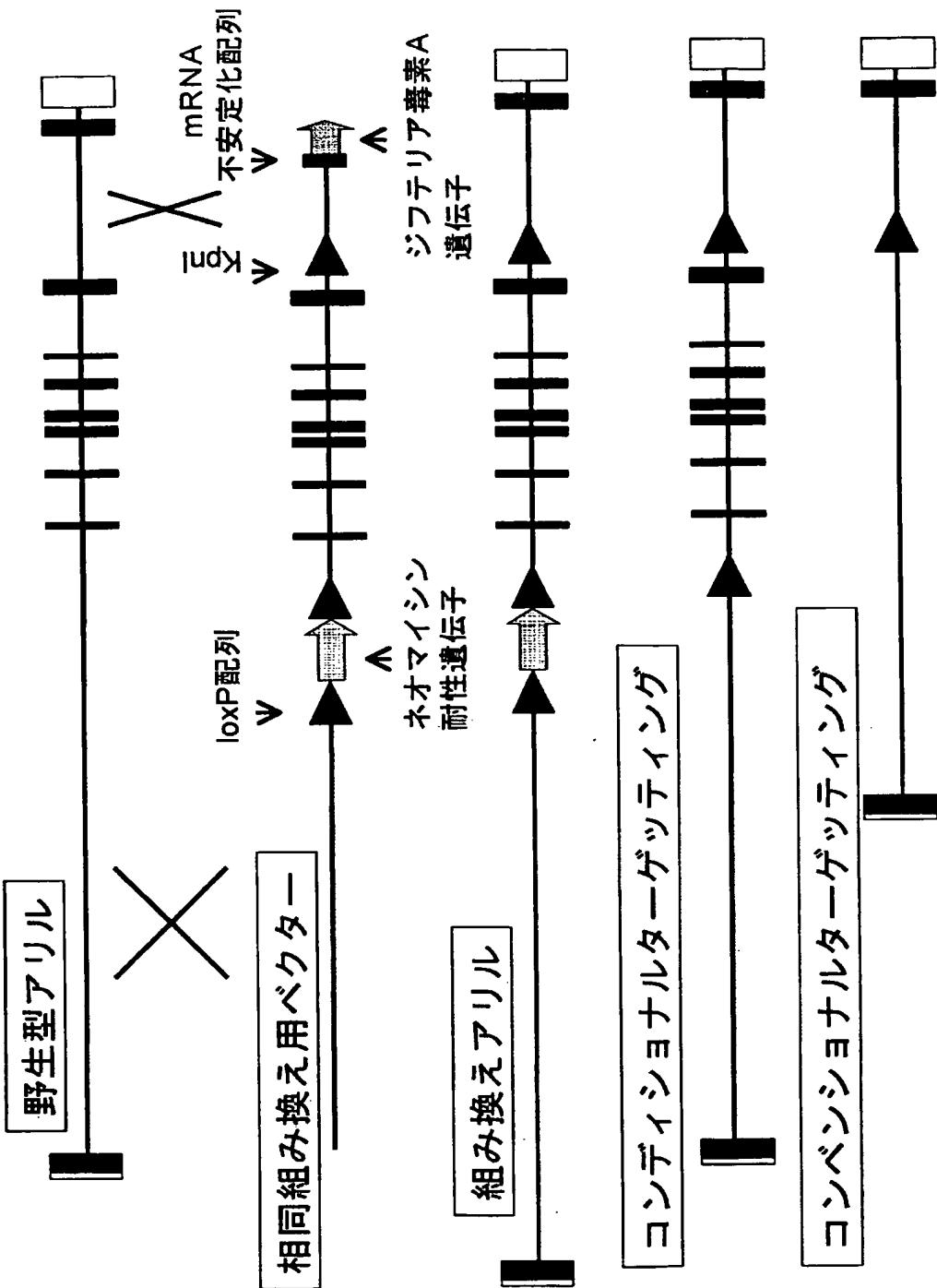
四 6

F23 合成リソル

Available restriction enzymes: **Bam**H, **Cla**I, **Ec**ORI, **Xba**I, **Xho**I

loxP2 倉成リソカ一

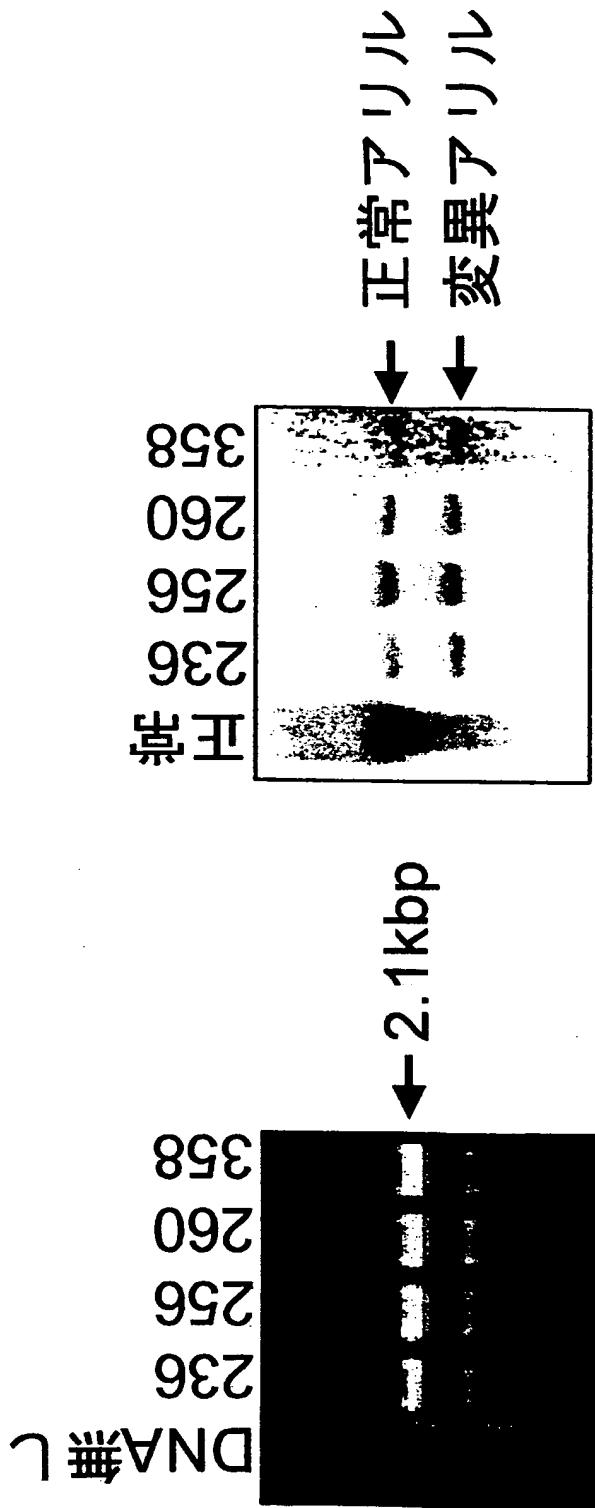
図 7



8 / 11

図 8

PCR解析
サンプルト解分析



9 / 11

図 9

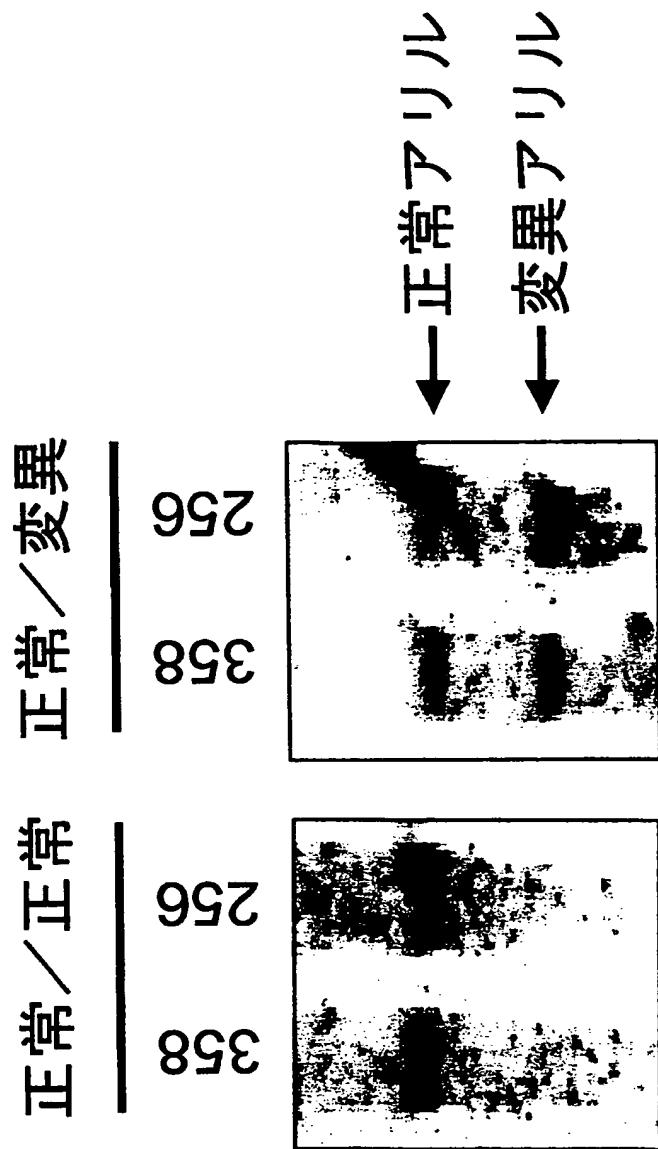
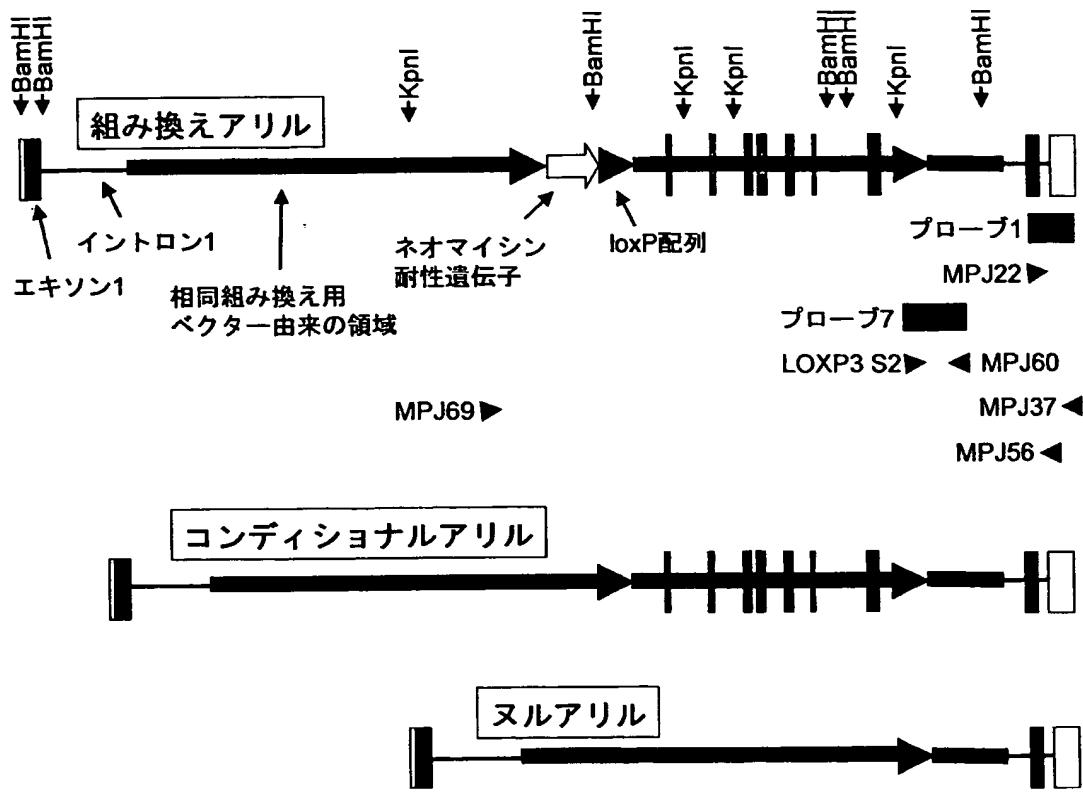
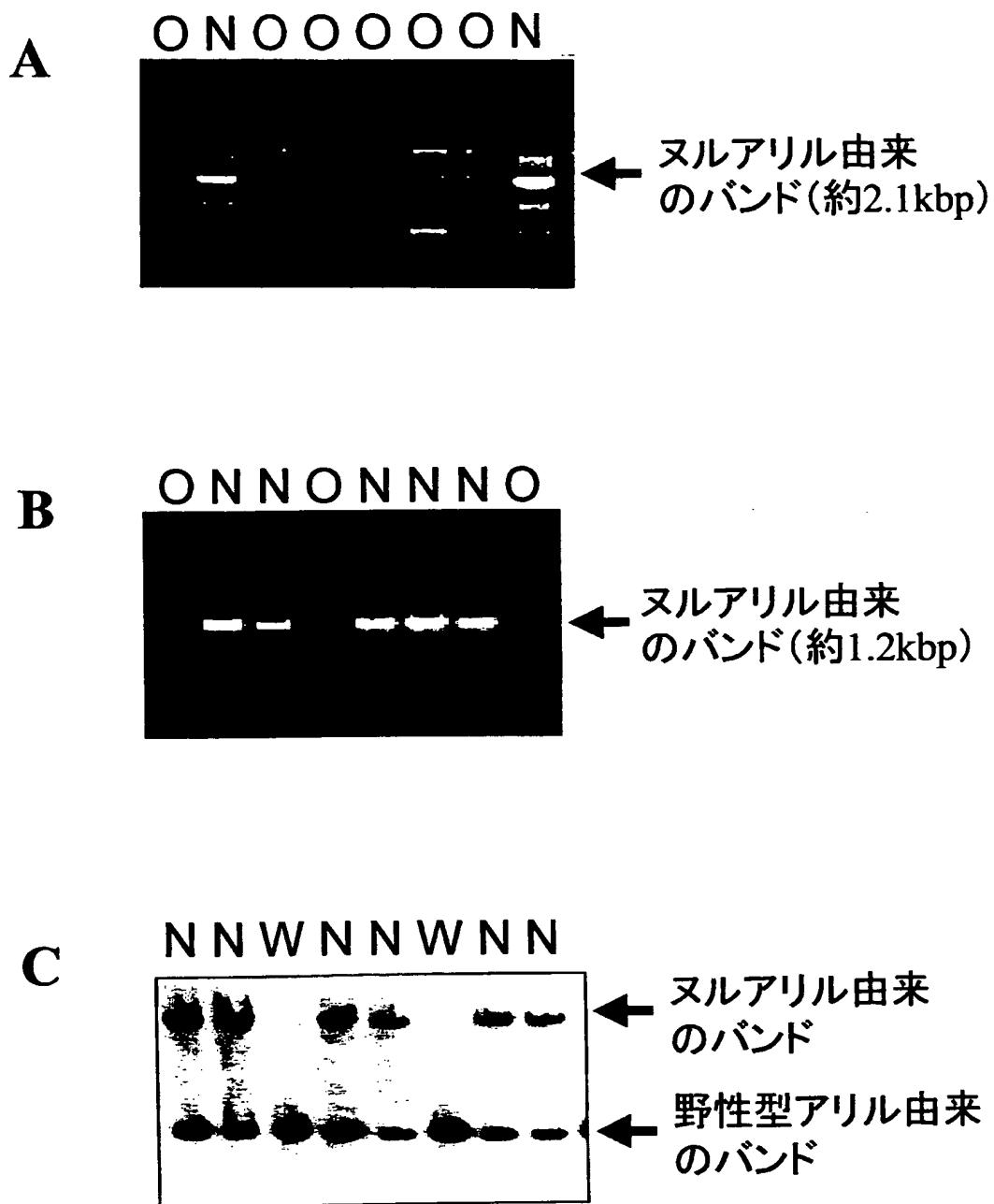


図10



11/11

図 11



SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> LKB1 gene knock out animal

<130> C2-103PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-153030

<151> 1999-05-31

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1795

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

<222> (51)..(1358)

<400> 1

aattcggatc caaggcggcc cgaaggacag aggacaaaga gtggccagg atg gac 56

Met Asp

1

gtg gcg gac ccc gag ccg ttg ggc ctt ttc tcc gag ggc gag ctg atg 104

Val Ala Asp Pro Glu Pro Leu Gly Leu Phe Ser Glu Gly Glu Leu Met

5

10

15

tcg gtg ggc atg gac acc ttc atc cac cgc atc gac tcc acc gag gta 152

Ser Val Gly Met Asp Thr Phe Ile His Arg Ile Asp Ser Thr Glu Val

20

25

30

atc tac cag ccg cgc cgc aaa cgc gcc aag ctc atc ggc aag tac ctg 200

Ile Tyr Gln Pro Arg Arg Lys Arg Ala Lys Leu Ile Gly Lys Tyr Leu

35

40

45

50

atg ggg gac ctg ctc ggg gag ggc tcg tac ggc aag gtg aag gag gtg 248

Met Gly Asp Leu Leu Gly Glu Gly Ser Tyr Gly Lys Val Lys Glu Val

55

60

65

ctg gac tcc gag acc tta tgc cgc agg gcg gtc aag atc ctc aag aag 296

Leu Asp Ser Glu Thr Leu Cys Arg Arg Ala Val Lys Ile Leu Lys Lys

70

75

80

aaa aag ctg cgc agg atc ccc aat gga gag gcc aac gtc aag aag gag 344

Lys Lys Leu Arg Arg Ile Pro Asn Gly Glu Ala Asn Val Lys Lys Glu

85

90

95

atc cag ctg ctg cgg cgg ctg cgg cat cgg aat gtg atc cag ctt gtg 392

Ile Gln Leu Leu Arg Arg Leu Arg His Arg Asn Val Ile Gln Leu Val

100

105

110

gac gtg ctg tac aat gag gag aag cag aag atg tat atg gtg atg gag 440

Asp Val Leu Tyr Asn Glu Glu Lys Gln Lys Met Tyr Met Val Met Glu

115

120

125

130

tac tgc gta tgt ggc atg cag gag atg ctg gac agt gtg ccg gag aag 488

Tyr Cys Val Cys Gly Met Gln Glu Met Leu Asp Ser Val Pro Glu Lys

135

140

145

cgc ttc cct gtg tgc caa gct cat ggg tac ttc cgc cag ctg att gac 536

Arg Phe Pro Val Cys Gln Ala His Gly Tyr Phe Arg Gln Leu Ile Asp

150

155

160

ggc ctg gaa tac cta cac agc cag ggc att gtt cac aag gac atc aag 584

Gly Leu Glu Tyr Leu His Ser Gln Gly Ile Val His Lys Asp Ile Lys

165

170

175

ccg ggc aac ctg cta ctc acc acc aat ggc aca ctc aag atc tcc gac 632

Pro Gly Asn Leu Leu Leu Thr Thr Asn Gly Thr Leu Lys Ile Ser Asp

180 185 190

ctc ggt gtt gcc gag gcc ctg cac cct ttc gct gtg gat gac acc tgc 680

Leu Gly Val Ala Glu Ala Leu His Pro Phe Ala Val Asp Asp Thr Cys

195 200 205 210

cgg aca agc cag ggc tcc ccg gcc ttc cag cct cct gag att gcc aat 728

Arg Thr Ser Gln Gly Ser Pro Ala Phe Gln Pro Pro Glu Ile Ala Asn

215 220 225

gga ctg gac acc ttt tca ggt ttc aag gtg gac atc tgg tca gct ggg 776

Gly Leu Asp Thr Phe Ser Gly Phe Lys Val Asp Ile Trp Ser Ala Gly

230 235 240

gtc aca ctt tac aac atc acc acg ggc ctg tac cca ttt gag ggg gac 824

Val Thr Leu Tyr Asn Ile Thr Thr Gly Leu Tyr Pro Phe Glu Gly Asp

245 250 255

aat atc tac aag ctc ttt gag aac att ggg aga gga gac ttc acc atc 872

Asn Ile Tyr Lys Leu Phe Glu Asn Ile Gly Arg Gly Asp Phe Thr Ile

260 265 270

cct tgt gac tgc ggc cca cca ctc tct gac cta ctc cga ggg atg ttg 920

Pro Cys Asp Cys Gly Pro Pro Leu Ser Asp Leu Leu Arg Gly Met Leu

275 280 285 290

gag tat gag ccg gcc aag agg ttc tcc atc cga cag att agg cag cac 968

Glu Tyr Glu Pro Ala Lys Arg Phe Ser Ile Arg Gln Ile Arg Gln His

295

300

305

agc tgg ttc cgg aag aaa cac cct ctg gct gag gcg ctc gta cct atc 1016

Ser Trp Phe Arg Lys Lys His Pro Leu Ala Glu Ala Leu Val Pro Ile

310

315

320

cca cca agc cca gac act aag gac cgc tgg cgc agt atg act gta gtg 1064

Pro Pro Ser Pro Asp Thr Lys Asp Arg Trp Arg Ser Met Thr Val Val

325

330

335

ccc tac ctg gag gac ctg cat ggc cgt gcg gag gag gag gag gaa 1112

Pro Tyr Leu Glu Asp Leu His Gly Arg Ala Glu Glu Glu Glu Glu

340

345

350

gac ttg ttt gac att gag gac ggc att atc tac acc cag gac ttc aca 1160

Asp Leu Phe Asp Ile Glu Asp Gly Ile Ile Tyr Thr Gln Asp Phe Thr

355

360

365

370

gtg cct gga cag gtc ctg gaa gag gaa gtg ggt cag aat gga cag agc 1208

Val Pro Gly Gln Val Leu Glu Glu Val Gly Gln Asn Gly Gln Ser

375

380

385

cac agt ttg ccc aag gct gtt tgt gtg aat ggc aca gag ccc cag ctc 1256

6/30

His Ser Leu Pro Lys Ala Val Cys Val Asn Gly Thr Glu Pro Gln Leu

390 395 400

agc agc aag gtg aag cca gaa ggc cga cct ggc acc gcc aac cct gcg 1304

Ser Ser Lys Val Lys Pro Glu Gly Arg Pro Gly Thr Ala Asn Pro Ala

405 410 415

cgc aag gtg tgc tcc agc aac aag atc cgc cgg ctc tcg gcc tgc aag 1352

Arg Lys Val Cys Ser Ser Asn Lys Ile Arg Arg Leu Ser Ala Cys Lys

420 425 430

cag cag tgactgaggc ctacagtgtc tcatcaggat ctctggcag gtgtccctgc 1408

Gln Gln

435

aaggctgggt tttccaggcc tgcctgtcca ctcaactcgg gacgttggag ccgagggcgg 1468

acctgctgcc ccagaagcac tttatgtcga gaccactggc cggccttgcc tgcattccgc 1528

cctgcgagcc tcgctgtctt tgggttggtt tcttttttt taataaaaca ggtggatttg 1588

agctatggct atgagggtgt ttggaaatat ggagcaggcgc gggcacaggg tggcctgcag 1648

agaaaaaccag agcaaacaaa tatgcagaga catttatgat taaccagaca acacgaccaa 1708

ccacagaggg cgcagggcag ggagtggca ggcactcaca gcgagtctgc cctatttt 1768

7/30

ggcaataaat aaagcttggg aaacttg 1795

<210> 2

<211> 436

<212> PRT

<213> **Mus musculus**

<400> 2

Met Asp Val Ala Asp Pro Glu Pro Leu Gly Leu Phe Ser Glu Gly Glu

1

5

10

15

Leu Met Ser Val Gly Met Asp Thr Phe Ile His Arg Ile Asp Ser Thr

20

25

30

Glu Val Ile Tyr Gln Pro Arg Arg Lys Arg Ala Lys Leu Ile Gly Lys

35

40

45

Tyr Leu Met Gly Asp Leu Leu Gly Glu Gly Ser Tyr Gly Lys Val Lys

50

55

60

Glu Val Leu Asp Ser Glu Thr Leu Cys Arg Arg Ala Val Lys Ile Leu

65

70

75

80

Lys Lys Lys Leu Arg Arg Ile Pro Asn Gly Glu Ala Asn Val Lys

8/30

85

90

95

Lys Glu Ile Gln Leu Leu Arg Arg Leu Arg His Arg Asn Val Ile Gln

100

105

110

Leu Val Asp Val Leu Tyr Asn Glu Glu Lys Gln Lys Met Tyr Met Val

115

120

125

Met Glu Tyr Cys Val Cys Gly Met Gln Glu Met Leu Asp Ser Val Pro

130

135

140

Glu Lys Arg Phe Pro Val Cys Gln Ala His Gly Tyr Phe Arg Gln Leu

145

150

155

160

Ile Asp Gly Leu Glu Tyr Leu His Ser Gln Gly Ile Val His Lys Asp

165

170

175

Ile Lys Pro Gly Asn Leu Leu Leu Thr Thr Asn Gly Thr Leu Lys Ile

180

185

190

Ser Asp Leu Gly Val Ala Glu Ala Leu His Pro Phe Ala Val Asp Asp

195

200

205

Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ser Pro Ala Phe Gln Pro Pro Glu Ile

210

215

220

9/30

Ala Asn Gly Leu Asp Thr Phe Ser Gly Phe Lys Val Asp Ile Trp Ser

225

230

235

240

Ala Gly Val Thr Leu Tyr Asn Ile Thr Thr Gly Leu Tyr Pro Phe Glu

245

250

255

Gly Asp Asn Ile Tyr Lys Leu Phe Glu Asn Ile Gly Arg Gly Asp Phe

260

265

270

Thr Ile Pro Cys Asp Cys Gly Pro Pro Leu Ser Asp Leu Leu Arg Gly

275

280

285

Met Leu Glu Tyr Glu Pro Ala Lys Arg Phe Ser Ile Arg Gln Ile Arg

290

295

300

Gln His Ser Trp Phe Arg Lys Lys His Pro Leu Ala Glu Ala Leu Val

305

310

315

320

Pro Ile Pro Pro Ser Pro Asp Thr Lys Asp Arg Trp Arg Ser Met Thr

325

330

335

Val Val Pro Tyr Leu Glu Asp Leu His Gly Arg Ala Glu Glu Glu

340

345

350

Glu Glu Asp Leu Phe Asp Ile Glu Asp Gly Ile Ile Tyr Thr Gln Asp

355

360

365

10/30

Phe Thr Val Pro Gly Gln Val Leu Glu Glu Val Gly Gln Asn Gly

370

375

380

Gln Ser His Ser Leu Pro Lys Ala Val Cys Val Asn Gly Thr Glu Pro

385

390

395

400

Gln Leu Ser Ser Lys Val Lys Pro Glu Gly Arg Pro Gly Thr Ala Asn

405

410

415

Pro Ala Arg Lys Val Cys Ser Ser Asn Lys Ile Arg Arg Leu Ser Ala

420

425

430

Cys Lys Gln Gln

435

<210> 3

<211> 5876

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> exon

<222> (1)..(84)

<220>

<221> intron

<222> (85)..(677)

<220>

<221> exon

<222> (678)..(767)

<220>

<221> intron

<222> (768)..(1231)

<220>

<221> exon

<222> (1232)..(1364)

<220>

<221> intron

<222> (1365)..(1431)

<220>

<221> exon

<222> (1432)..(1568)

<220>

<221> intron

<222> (1569).. (1852)

<220>

<221> exon

<222> (1853).. (1980)

<220>

<221> intron

<222> (1981).. (2243)

<220>

<221> exon

<222> (2244).. (2301)

<220>

<221> intron

<222> (2302).. (3102)

<220>

<221> exon

<222> (3103).. (3299)

<220>

<221> intron

<222> (3300).. (5103)

<220>

<221> exon

<222> (5104)..(5310)

<220>

<221> intron

<222> (5311)..(5454)

<220>

<221> exon

<222> (5455)..(5876)

<400> 3

ggagatccag ctgctgcggc ggctgcccga tcggaatgtg atccagcttg tggacgtgct 60

gtacaatgag gagaaggcaga agatataatcc tgggggtggg gtgggctggg gtggccctg 120

tgttagggc tggaaaggcctt ctgcaaggcc tctggcagca atagtgcac atgtcatcct 180

gtgggtgcctg tcagctcatc aggcaggggc gcaaggcatg gggcttccac ctggtgccag 240

cctgttctga gcagtgtggc tgggactggg catggcctca cagggacttg gggctatgt 300

acattgacag ggcccccggct ggttcttagag gtttccatgc tgccccccttcc cagaggtaga 360

ggttgcacag cctacgttgc atctggcag tcctgggagc attctgagaa cccagtgc 420

tgcaaaaaa actcctggta cccatctctc cctgtggcta gtacaccagc tgatttcagt 480

cctgtttaa tctatgctga ctccatgtgg tccaagtcac tgtggtggtc ttgtggaccc 540

tgtgagttact gatagggagc gcagaatggc gggagagcag agtggtggtg gtctgtggc 600

ccagcggggc cctccagacc actgttgcta ggagcagggc tcctgggctt ggtgtgctgc 660

tttccttagc gccctacgta tatggtgatg gactactgctg tatgtggcat gcaggagatg 720

ctggacagtg tgccggagaa gcgcttcct gtgtgccaag ctcatgggtg agtgcctgc 780

tgggtgcagg aggagcagcc attgtcagga aacccaggtg tttctggcc cccagtttt 840

aacccagcca atgtgcttag gtttaccctc ttgttaggcc ctgtggccc gctgcctgc 900

agagccatag tgggtctgag tcctgttcag tgctcccagg ttcagcagaa tcacatcccc 960

tggtagcag agaacaagg gaaggaaagg gaaggaagca agccagaggg gaaacctggc 1020

tccctgggcc tggcagcag tgactgccag ttgcctgtg taattttagt ggcccagcct 1080

tctgactctc aggtctgttt gcctgagccc taaacatcta tcacctgtta ggccaggtct 1140

catgagtctc ccaaacttca tatcagactt atgttagtac catggatgg gctgagacac 1200

tgtggggcct gagccagtcc cacccattca ggtacttccg ccagctgatt gacggcctgg 1260
aataccataca cagccagggc attgttcaca aggacatcaa gccgggcaac ctgctactca 1320
ccaccaatgg cacactcaag atctccgacc tcggtgttgc cgaggttaggc accatgtgca 1380
gggatcatgg gccgcttctc ctgagctgcc ctgactctca ctgcccgtca ggcctgcac 1440
ccttcgctg tggatgacac ctgccggaca agccaggct cccggcctt ccagcctcct 1500
gagattgcca atggactgga cacctttca gtttcaagg tggacatctg gtcagctggg 1560
gtcacactgt aagtgtcttg tgtgtaccct gtacgatgt gggggctgtg gttttccct 1620
agtgttcttg ggccttttg cccacagtgt gtggctagca gttggacat tccaggtctg 1680
tgggtgttgt tcctcaccct accccacccc actccacagg gtttgcttg cacacagatg 1740
taggtgccat gactgcacat ctaccagtta acatgtgtcc tgtctggag ttggggcacc 1800
tgtccctctgg tctccagtgt ggccagcact gacactcttt tcctatgtga agttacaaca 1860
tcaccacggg cctgtaccca tttgaggggg acaatatcta caagctctt gagaacattg 1920
ggagaggaga cttcaccatc cttgtgact gggccacc actctctgac ctactccgag 1980

gtgggcatct ctaaatcacc caaatgttag gacagcaagg gacagagccc ctggtctgga 2040

ggggttctga ccttactgtc aggacagcct ttgtccgcca ggatgggagg tttctgagat 2100

tgcttccccc catctggggc cgggggtgggt gggtggggtc tcagtgtat gggcctagg 2160

aaggccaagg ggatggatgc tgttagtggtg ctgttagcaca aagcaggcac ctgctacact 2220

cacttatctc ttctgtccta cagggatgtt ggagtatgag ccggccaaga ggttctccat 2280

ccgacagatt aggcagcaca ggtgagcatg gccggcctgt ctcagcctgc tgggggtctg 2340

agctgagaac atggtctcag aggtgctagg tcatcacagg agtaaggatc agtgtgctgt 2400

gtgtattgat gtctgggaag gctgtgttg aacttgggt gtgacagggg tgcccaatgc 2460

aggcctccct acctttatca ttttgttcag gagtgcaggc gttatgtggc ctgagaagct 2520

gttagatttca gggcctagaa ttagagacgg atcctccat ggtggggagg gaggagtaga 2580

tggggaaagtg tcactttgga tcccagctgt tccttggcca tctggacatg gaaatgtgtc 2640

tagggaggcc aacaggaagc gtgaggcatg gtgtcttcc tcacctgagg ctaagagcct 2700

tctggtaac agtggagcct ctgtcctccc tttgtttatt taccagctgg tcagagcctt 2760

tgggtccagg cttctctgtc ctcttctccc ttcatgctag actgagactg gctagctgg 2820

gtgtccccca gtgagggctt ctagcctatc cgtgttcaag gcgggtggga ctataggtgc 2880

agggacctga ttgcccaccc tagtccaagg cgctgtggct gtcatcagtg ggtggtggtt 2940

tgtgccagtg ctatgggtgt taggctacct caagcctgta gccggagcac taaggcctcg 3000

tcttatgtaa ggacagccat ggtgtggct ttggtggtt ttggccagcc gtggtcacag 3060

tgcctggcac ctgatgtctg tgctgcactt ggccttcttt agctggttcc ggaagaaaca 3120

ccctctggct gaggcgctcg tacctatccc accaagccca gacactaagg accgctggcg 3180

cagtagtact gttagtgcctt acctggagga cctgcattggc cgtgcggagg aggaggagga 3240

ggaagacttg tttgacattt aggacggcat tatctacacc caggacttca cagtgcctgg 3300

taagctggct tggcgagct cctactggag ctggtgactt tgtgcactt gggctggc 3360

cccttccaa gtctccagcc agctaacatg agccaccagg actgc当地ccaaag ccatcctgg 3420

ggctgtggca tttcactctg ggcttagatga agggctccct ggctgcattt agcaggagga 3480

ggggaaaccct ggagggcagt ggtaggggc cctgagacag ccacctgagg gagggtccag 3540

tggccctcgg tcctggccat gcctgacacctt atatgcctt cttccccagg tgtcgaggag 3600

gcggccgagg cagggcttag cgaggatgca tgcgacacat gcatgtggaa gagccagggc 3660

gcaggccttc ctggagagga gcccgaggag gggtttgggg ctttagtcta gctccctgtc 3720

tgctgccccca cccatgtcct ccataaagct ttgtccactg tgtctgcagg tggatgctt 3780

ccgcgacttc cctcctgtca ctaccctgac aggctccccca ccagggtttc agagaacatg 3840

cctgggtcca aggccctgagc taggtcctca gtgccagggt ggccaccagc cagggctct 3900

tggggccttt gttcctgtgg cctgcatgcc agtcccactt agctcctggc ctttcaaata 3960

gctttgggtgg gagggttaagg accttggct actgtgtctc ctgttagcaat tgagagttct 4020

aatagcagtg cccgctgggt gccaggtgga atccacaagg acaggtatac acctgatgtc 4080

cagtatgggc cttggccaca gccctttcta aggtttaaag catccctatg tggaaatagt 4140

gtcttctact ctgtcacgtg gagcccttgt ctagactgtc ccacaggctg ggctcctggc 4200

tgagagctgg tttctctgct ggggagaaga tgtacttagg tgctgggtgc atgagggacc 4260

cttaaggctg ctgtggtttg aaggaaggca agggtctggg gacactgggtt ggccatggag 4320

cccatggc aaatgggta gtgtgcaca gagtgaagt accgtgtct gaggatagcc 4380

tgatccctct gtacttggca tgagggtcgg actctgcagc aacaggacag gggcttctta 4440

ctcagtgccct tgtgtggagg agggacaga tgcttctca gagtccacct gacctaagc 4500

ctcagtccta tgcagagtga gccagagtgg gtgctgtag tgtggccaag tcagagggtt 4560

tgggagagaa attctggatc caggagcgtg ggcagtggc tgtgtgtgg gttccacagc 4620

cgcattgcca agcactggac tgtggagtta catgtagaca ctgacacctg gacccctgg 4680

agcttcagga gaggccatct ttgtccac tgcgagggca gccaacaga gcaagctgg 4740

ctgcagccct cagctggatg atctccttcc cggtgctcat cgcagctagt agctccagg 4800

ccgaatgcct catctccttg tgcctgtact gagggtctag agcctctccc ttggagagct 4860

ctgtgagctg gtgctggct gcccaggcta gacaggcagg tgagcgtgg catgctgcag 4920

gagggccagg gcatagcact gtgaaggcag tggcctgct tgccttgga gctactgagg 4980

ggtgtggtggc accagaggct agagcacctc cgaccagcct ctgtcacagt tggggctggc 5040

tggccctgg ggctttagc tacctgcccc ttggctcaag ctatgcttgc catttcccg 5100

taggacaggt cctggaagag gaagtgggtc agaatggaca gagccacagt ttgcccaagg 5160

ctgtttgtt gaatggcaca gagccccagc tcagcagcaa ggtgaagcca gaaggccgac 5220

ctggcaccgc caaccctgct cgcaagggtt gctccagcaa caagatccgc cggctctcgg 5280

cctgcaagca gcagtgactg aggcctacag gtgggcatgg gcctgggtcc agccatccct 5340

ggtgttcaca gtgggtgtct gctgggctcc tagtccttc ccgttagggca gtgctgcaag 5400

gggaaaggta tggtggttga ggtggtacta agtggaccacc cattctacca acagtgtgtc 5460

atcaggatct ctgggcaggt gtccctgcaa ggctgggttt tccaggcctg cctgtccact 5520

cacttcggga cgttggagcc gagggcggac ctgctgcccc agaagcactt tatgtcgaga 5580

ccactggccg gccttgcctg catgccgccc tgcgagcctc gctgtcttg gttggtttc 5640

tttttttta ataaaacagg tggatttgag ctatggctat gagggtgttt gaaatatgg 5700

agcaggcggg gcacagggtg gcctgcagag aaaacccaga gcaaacaat atgcagagac 5760

atttatgatt aaccagacaa cacgaccaac cacagagggc gcagggcagg gagtggcag 5820

gcactcacag cgagtctgcc ctatctttg gcaataaata aagcttggga aacttg 5876

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

gatgaattcc gaaggacaga ggacaaagag tgg 33

<210> 5

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

gatgaattct tagaggtctt cttctgagat gagcttctgc tcctgctgct tgcaggccga 60

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

tgcgcagtt ttcttcttg agga 24

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

ggtgatggag tactgcgtgt g 21

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

ggtaaagtct cctctcccaa tgtt 24

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

actgcagctg acccaaggcca ggat 24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

cgaaggacag aggacaaaga gtgg 24

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Linker Sequence

<400> 11

tgcgacacat cgataccgct cgagtgc 27

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Linker Sequence

<400> 12

aattcgactc gagcggtatc gatgtgtcgc atgca 35

<210> 13

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Linker Sequence

<400> 13

ctagtcaagc ttcataactt cgtatagcat acattatacg aagttatcga attcgacctg 60

gatcccataa cttcgtagatg catacattat acgaagttat caagcttcc 109

<210> 14

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Linker Sequence

<400> 14

tcgaggaagc ttgataactt cgtataatgt atgctatacg aagttatggg atccaggtcg 60

aattcgataa cttcgataa tgtatgtat acgaagttat gaagcttga 109

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

Synthesized Linker Sequence

<400> 15

gatgttccac ctcgagccca ggctccagag gtcagt 36

<210> 16

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 16

gatctcgaga tcgatggta cggtgttcca cataacttcg tatagcatac attatacgaa 60

gttatctgtc cactgtgtct gcaggt

86

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 17

ccggtgttcc acataacttc

20

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 18

gttcccaag ctttatttat tgcc

24

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 19

cagcagcaag gtgaagccag aagg

24

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 20

cctttggctg ctgggtgact tctg

24

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30/30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 21

acagagctct ccaagggaga 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 22

ctctcccaaa ccctctgact 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03504

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01K 67/027,
 Int.Cl⁷ C12N 15/63,
 C12N 5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01K 67/027,
 Int.Cl⁷ C12N 15/63,
 C12N 5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2000	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DIALOG (BIOSIS)
 JOIS (JICST FILE)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y3	Byoutai Seiri, Vol.14, No.12, 961-966, (1995)	1-27
A	Biochemical and Biophysical Research Communication, Vol.261, No.3, 750-755 (1999)	1-27
A	Human Molecular Genetics, Vol.8, No.8, 1479-1485 (1999)	1-27
Y1	Nature, Vol.391, 184-187 (1998)	1-27
Y1	Nature Genetics, Vol.18, 38-43 (1998)	1-27
Y2	Nature, Vol.336, 348-352 (1988)	1-27
Y3	Idenshi Igaku, Vol.2, No.4, 612-617 (1998)	1-27

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
29 August, 2000 (29.08.00)Date of mailing of the international search report
12 September, 2000 (12.09.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

A01K 67/027,
Int. Cl' C12N 15/63,
C12N 5/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

A01K 67/027,
Int. Cl' C12N 15/63,
C12N 5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-2000年
日本国登録実用新案公報 1994-2000年
日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

DIALOG (BIOSIS)
JOIS (JICSTファイル)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y 3	病態生理, Vol. 14, No. 12, 961-966, (1995)	1-27
A	Biochemical and Biophysical Research Communication, Vol. 261, No. 3, 750-755, (1999)	1-27
A	Human Molecular Genetics, Vol. 8, No. 8, 1479-1485, (1999)	1-27
Y 1	Nature, Vol. 391, 184-187, (1998)	1-27
Y 1	Nature Genetics, Vol. 18, 38-43, (1998)	1-27

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 29.08.00	国際調査報告の発送日 12.09.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 坂田 誠 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3236

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y 2	Nature, Vol. 336, 348-352, (1988)	1-27
Y 3	遺伝子医学, Vol. 2, No. 4, 612-617, (1998)	1-27